

Aus dem Institut für Bakteriologie und Mykologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

und der Projektgruppe Biologische Sicherheit des Robert Koch-Instituts, Berlin

**Isolierung und Charakterisierung eines phagenähnlichen Bacteriocins und
eines virulenten Phagen und deren therapeutische Einsatzmöglichkeiten gegen
Yersinia enterocolitica-Infektionen**

Inaugural-Dissertation

*zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig*

eingereicht von
Heike Maria Kaspar
aus Wadern

Leipzig, 2003

Mit Genehmigung der der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan Prof. Dr. Gotthold Gäbel

Betreuer Prof. Dr. Monika Krüger

Gutachter Prof. Dr. Monika Krüger
 Institut für Bakteriologie und Mykologie
 Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Prof. Dr. Bernd Appel, Robert Koch-Institut, Berlin

Prof. Dr. Stefan Schwarz, Institut für Tierzucht, Neustadt/Mariensee

Prof. Dr. Andreas Hensel, Institut für Risikobewertung, Berlin

Tag der Verteidigung: 10.11.2003

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	<i>Yersinia</i>	3
2.2	Yersiniosen	4
2.3	Bacteriocine	7
2.4	Bakteriophagen.....	11
3	Material und Methoden	16
3.1	Bakterienstämme und Stammhaltung.....	16
3.1.1	<i>Y. enterocolitica</i> 29930.....	16
3.1.2	<i>Y. enterocolitica</i> 13169.....	16
3.1.3	<i>E. coli</i> XL1-Blue MR.....	16
3.2	Vektoren	17
3.2.1	Supercos 1.....	17
3.3	Nährmedien, Chemikalien	17
3.3.1	Luria-Bertani (LB)-Medium (SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989).....	17
3.3.2	M9 Minimalmedium.....	17
3.3.3	MOX-Agar.....	18
3.3.4	CIN-Agar (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar nach Schiemann)	18
3.3.5	SOC-Medium	18
3.4	Test auf das Vorhandensein des Virulenzplasmids bei <i>Y. enterocolitica</i> 13169.....	19
3.5	Herstellung von Enterocoliticin	19
3.5.1	Produktion im 2,4 l Maßstab.....	19
3.6	Reinigung des Enterocoliticin	20
3.6.1	Zentrifugation.....	20
3.6.2	Reinigung über FPLC/Gelfiltration.....	21
3.7	Aktivitätstest für das Enterocoliticin	21
3.7.1	Herstellen von Softagar 0,7 %.....	21
3.7.2	Gießen der Softagar-Overlayplatten.....	21
3.7.3	Aktivitätstest nach FALKINER u. KEANE (Softagar-Overlaytest)	22
3.8	Restriktionsverdau	23
3.9	Erstellung einer Cosmidgenbank.....	23
3.9.1	Partialverdau.....	24
3.9.2	Saccharosegradient	24
3.9.3	Austropfen des Gradienten	25
3.9.4	Überprüfung der gefällten Saccharosegradient-Fragmente aus dem Saccharosegradienten	26
3.9.5	Transformation des Vektors Supercos in <i>E. coli</i> XL1-Blue MR	26

3.9.5.1	Herstellung kompetenter Zellen von <i>E.coli</i> XL1-Blue MR	26
3.9.5.2	Transformation.....	27
3.9.6	Plasmidisolierung aus transformiertem <i>E.coli</i> XL1-Blue MR	27
3.9.7	Präparation Vektor-DNA für Supercos-Ligation	27
3.9.8	Ligation Supercosvektor und Fragmente.....	28
3.9.9	Infektion von <i>E. coli</i> VCS 321 mit Lambda-Phage und Vektor	29
3.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
3.11	Färbemethoden	32
3.11.1	Coomassieblau-Färbung.....	32
3.11.2	Silbernitratfärbung.....	32
3.12	Western Blot für die N-terminale Sequenzierung der Hauptproteinbanden	32
3.13	Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden	34
3.13.1	Southern Blot	34
3.13.2	Synthese von Oligonukleotidsonden	34
3.13.3	Hybridisierung	35
3.14	Isolierung virulenter Phagen	36
3.15	Bestimmung des Phagentiters	36
3.16	Vermehrung und Reinigung virulenter Phagen	37
3.17	Präparation von Phagen-DNA	38
3.18	Agarose-Gelelektrophorese	39
3.19	Zellkulturversuche	40
3.19.1	Invasions- und Adhäsionsversuche.....	40
3.20	Tierversuch.....	41
3.20.1	Tiere und Haltungsbedingungen	41
3.20.2	Infektion der Tiere	41
3.20.2.1	Herstellung des Inokulums.....	41
3.20.2.2	Infektion der Mäuse	42
3.21	Überprüfung des Serovars.....	42
3.22	Bestimmung des Enterocoliticens- bzw. des Phagentiters	43
3.23	Elektronenmikroskopie	43
4	Ergebnisse.....	44
4.1	Charakterisierung des Enterocoliticin	44
4.1.1	Produktion von Enterocoliticin	44
4.1.2	Chromatographieverfahren	44
4.1.3	Ultrazentrifugationsverfahren	45
4.1.4	Reinigungsschema für Enterocoliticin aus <i>Y. enterocolitica</i> 29930	46
4.1.5	Gelfiltration.....	47

4.1.6	Charakterisierung der Eigenschaften des Enterocoliticens.....	49
4.1.6.1	Produktionskurve Enterocoliticin	49
4.1.6.2	Stabilität bei Proteinase K.....	50
4.1.6.3	Elektronenmikroskopie.....	50
4.1.6.4	Wirkungsspektrum des Enterocoliticens.....	52
4.1.7	Sequenzieren der Hauptproteinbanden.....	54
4.1.8	Hybridisierungsversuche.....	58
4.1.9	Screening der Cosmidgenbank.....	62
4.2	Charakterisierung des Phagen PY 100	64
4.2.1	Plaquemorphologie	65
4.2.2	Phagenvermehrung und –aufreinigung	66
4.2.3	Genomgröße des Phagen.....	66
4.2.4	Darstellung der Phagenproteine in der SDS-PAGE.....	67
4.2.5	Wirtsspektrum PY 100	67
4.3	Zellkulturversuche.....	70
4.3.1	Zellkulturversuche mit dem Enterocoliticin	70
4.3.2	Zellkulturversuche mit dem Phagen PY 100.....	74
4.4	Mausdiarrhoemodell- Therapieversuche	74
4.4.1	Tierpassage des Stammes <i>Y. enterocolitica</i> 13169.....	75
4.4.2	Verlauf der Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i> 13169	75
4.4.3	Therapie mit Enterocoliticin.....	76
4.4.4	Therapieversuch mit dem Phagen PY 100.....	80
4.4.4.1	Therapieversuch mit dem Phagen PY 100-Gabe intraperitoneal.....	80
4.4.4.2	Einmalige Phagengabe intraperitoneal.....	83
4.4.4.3	Therapieversuch mit dem Phagen PY 100, Gabe oral.....	86
4.4.4.3.1	Therapieversuch, einmalige Phagengabe oral.....	86
4.4.4.3.2	Therapieversuch mit PY 100-Gabe oral, mehrfache Gabe.....	89
5	Diskussion.....	93
5.1	Charakterisierung des Enterocoliticens	93
5.2	Charakterisierung des Phagen PY 100	99
5.3	Therapieversuche	100
5.3.1	Zellkultur	101
5.3.1.1	Zellkulturversuche mit Enterocoliticin	102
5.3.1.2	Zellkulturversuche mit PY 100.....	102
5.3.2	Tierversuch	103
5.3.2.1	Therapieversuche mit dem Enterocoliticin.....	104
5.3.2.2	Therapieversuche mit dem Phagen PY 100.....	105

6	Zusammenfassung der Ergebnisse	107
7	Summary	109
8	Literaturverzeichnis	111
9	Anhang	123
9.1	Tabellen	
9.2	Abbildungsverzeichnis	
9.3	Tabellenverzeichnis	

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
A. bidest	Doppelt destilliertes Wasser (lat.: Aqua bidestillata)
<i>Agrobact.</i>	<i>Agrobacterium</i>
<i>ail</i>	attachment invasin locus
ALEX	Ionenaustausch-Chromatographie
Appl.	Applikation
APS	Ammoniumpersulfat
<i>Bc.</i>	<i>Bacillus</i>
Bis	Bisacrylamid
bp	Basenpaare (engl.: base pairs)
C	Cytosin
Ca	Caecum
Ca ²⁺	Calcium
CFU	colony forming units
CIAP	Calf intestine alkaline phosphatase
CIN	Cefsoludin-Irgasan-Novobiocin-Agar nach Schiemann
CsCl	Cäsiumchlorid
Da	Dalton
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GF	Gelfiltration
G	Guanin
GUT	Gut associated lymphoid tissue
HEp	human epithelial cells
II	Ileum
Inf.	Infektion
Inv	Invasin
K	Guanin oder Thymin
kbp	Kilobasenpaare (engl.: kilo base pairs)
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
Le	Leber
LB	Luria-Bertani Medium

Abkürzungsverzeichnis

log	dekadischer Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
mM	Millimolar
MOX	Magnesium-Oxalat
Mz	Milz
N	Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin
NaCl	Natriumchlorid
Na-oxalat	Natriumoxalat
ng	Nanogramm
Ni	Niere
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
<i>Ps.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PVDF	Polyvinylfluorid-Membran
PY	<i>Yersinia</i> -Phage
pYV	Virulenzplasmid aus <i>Yersinia</i>
R	Adenin oder Guanin
rpm	rounds per minute
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
+/- s	Standardabweichung
<i>Sc.</i>	<i>Streptococcus</i>
SDS	Sodiumdodecylphosphat
<i>St.</i>	<i>Staphylococcus</i>
ssp.	subspecies
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat mit EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Ther.	Therapie
To	Tonsillenäquivalent
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Aktivitätseinheit (units)

Abkürzungsverzeichnis

v/v	Volume per volume
w/v	Weight per volume
Y	Cytosin oder Thymin
Y.	<i>Yersinia</i>
Yad A	<i>Yersinia</i> Adhäsion A
Ysc	Yop Sekretion
Yst	Hitzestabiles Enterotoxin aus <i>Yersinia</i>
Yop	<i>Yersinia</i> outer membrane protein

1 Einleitung

Nach der Entdeckung des Penicillins durch Fleming Ende der zwanziger Jahre des letzten Jahrhunderts glaubte man lange Zeit, die Gefahr bakterieller Infektionen eingedämmt und überwunden zu haben. Doch in den letzten Jahren wandelte sich die Lage:

Bereits überwunden geglaubte Keime tauchen nun als Hospitalismuskkeime auf und bereiten bei nosokomialen Infektionen große Probleme, da sie mittlerweile hochresistent sind und nur durch sehr wenige Antibiotika einzudämmen sind. Die sich so verschlechternde Resistenzlage ist nicht zuletzt begründet durch den jahrelangen Antibiotikamißbrauch in der Tierzucht und der Tiermast in Form von Masthilfsmitteln bzw. der prophylaktischen Antibiotikagabe. Weiterhin ist die oftmals leichtfertige Verwendung von Breitspektrum-Antibiotika in der Veterinär- wie in der Humanmedizin ohne entsprechendes Resistogramm und ohne die entsprechenden Keime zu identifizieren und ein spezifisch wirksames Mittel dagegen einzusetzen, dafür mitverantwortlich. Als Beispiel kann hier *Pseudomonas (Ps.) aeruginosa* dienen, dessen Resistenzlage sich derart verschlechtert hat, dass der Keim kaum noch zu behandeln ist, so dass bereits simple Sekundärinfektionen ein großes Problem darstellen (WILLIAMS, 1976). Ebenso dramatisch ist es um *Enterococcus (E.) faecium* bestellt, wo es zahlreiche Stämme gibt, die gegen Virginiamycin resistent sind. Virginiamycin wurde in den letzten 20 Jahren verstärkt in der Geflügel- und Schweinemast eingesetzt (BISWAS *et al.*, 2002). Als Folge können verstärkt resistente Stämme aus Geflügel isoliert werden.

Weiterhin werden sowohl über den Kot von Antibiotika-therapierter Menschen als auch bei Tieren Antibiotika in großer Menge ausgeschieden. Auf diese Weise wird die Verbreitung der Resistenzbildung bei Prokaryonten stark gefördert.

Die Anzahl der Todesfälle durch Problemkeime steigt wieder an, allein in den USA sterben geschätzt jährlich 14000 Menschen an Infektionen durch resistente Keimen (EBERLE, 2002). In Dänemark trat 1998 eine *Salmonella (S.)* Typhimurium-Epidemie auf, bei der die Keime gegen sieben verschiedene Antibiotika resistent waren (WHO, 2000). Die Infektionskette erfolgte über Schweinefleisch.

Es muß also dringend nach alternativen Wegen gesucht werden, um bakterielle Infektionen mit neuen Methoden zu bekämpfen, oder aber die Infektionsgefährdung für den Menschen zu senken; also auf prophylaktischer Basis zu arbeiten.

Diese Suche nach alternativen Wegen stellt das Ziel dieser Arbeit dar: es soll nach Alternativmöglichkeiten gesucht werden, pathogene Yersinien bereits im Tier ganz spezifisch zu bekämpfen, so dass die Übertragungskette zum Menschen unterbrochen werden kann. Diese Eliminierung im Tier soll durch eine spezifische Erregerbekämpfung geschehen, so dass so gut wie keine anderen Bakterien davon betroffen sein sind.

2 Literaturübersicht

2.1 *Yersinia*

Die Gattung *Yersinia*, benannt nach dem Entdecker des Pesterregers Alexandre Yersin, gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae*, die seit Beginn der achtziger Jahre durch DNA-Hybridisierungsexperimente eine Einteilung in 11 Species (HEESEMANN, 2001) erfahren haben, die teilweise noch weiter in Biovare und Serovare aufgegliedert werden. Zu den tier- bzw. humanpathogenen Species zählen *Yersinia* (*Y.*) *pestis*, sowie *Y. pseudotuberculosis* und einige Serovare von *Y. enterocolitica* als enteropathogene Vertreter (BERCOVIER *et al.*, 1984). Es sind über 70 Serovare der Spezies *Y. enterocolitica* bekannt (BOTTONNE, 1997).

Die Identifizierung der einzelnen Spezies erfolgt durch verschiedene biochemische Tests, zum Beispiel ob verschiedene Zucker (Saccharose, Rhamnose und Melobiose) fermentiert werden können (ALEKSIC u. BOCKEMÜHL, 1990), oder auch die Fähigkeit zur Citratverwertung nach Simmons kann zur Identifizierung herangezogen werden.

Die Spezies *Y. enterocolitica* läßt sich einerseits biochemisch in bis zu 8 verschiedene Biovare unterteilen (WAUTERS, 1987), andererseits lassen sie sich serologisch differenzieren anhand ihrer O- und H-Antigene (ALEKSIC *et al.*, 1986). Allgemein durchgesetzt hat sich die Doppelcharakterisierung durch Bestimmung des Biovars und der O-spezifischen Antigene für diese sehr heterogene Spezies.

Virulente Stämme können verschiedenste Virulenzfaktoren exprimieren. Diese Virulenzfaktoren sind teils chromosomal kodiert, zum Teil liegen sie auch auf dem hochkonservierten 70 kb-Plasmid vor, das nach Portnoy und Falkow pYV abgekürzt wird (CORNELIS, 1994; ROBINS-BROWNE *et al.*, 1985; PORTNOY u. FALKOW, 1981). Alle humanpathogenen Yersinien tragen dieses Plasmid (AUTENRIETH, 1996). Mit diesen Faktoren ist es den Yersinien möglich, die Verteidigungsmechanismen des Wirtes zu umgehen und sich extrazellulär im Wirt oder in Makrophagen zu etablieren. Zu den chromosomal kodierten Virulenzfaktoren gehören die Invasionsgene *inv* (Invasin) und *ail* (attachment invasion locus) sowie ein hitzestabiles Enterotoxin Yst und das Yersiniabactin, ein Siderophor. Das Gen für das Siderophor sowie die Gene für den Siderophorrezeptor kodieren ein kompliziertes Eisenaufnahmesystem, das verantwortlich ist für die unterschiedlichen Pathogenitätspotentiale von mausletalen (*Y. enterocolitica* O:8) und nicht-mausletalen *Y. enterocolitica*-Stämmen (Serovar O:3 und O:9) (AUTENRIETH, 1996). Die mausletalen *Y. enterocolitica*-Stämme, die über das Eisenaufnahmesystem verfügen,

werden als hochpathogen angesehen (CARTER, 1975) und können vorwiegend in den USA isoliert werden, die nicht-mausletalen, weniger pathogenen Stämme dominieren in Europa. Plasmidkodiert sind die Virulenzfaktoren, die zur Adhärenz und für die Invasivität wichtig sind (Yad A-Protein), die antiphagozytären Proteine (Yops), Regulationsproteine (Ysc = Yop secretion complex) und Sekretionsproteine, z.B. das Lcr-Protein (= low calcium response). Die Expression dieser Virulenzfaktoren ist temperaturabhängig und findet bei 37 °C und Calcium-Mangel statt (STRALEY u. PERRY, 1995; HIGUCHI u. SMITH, 1961).

2.2 Yersiniosen

Y. enterocolitica ist nach *Salmonella* spp. und *Campylobacter* spp. einer der häufigsten Erreger bakterieller Enteritiden (AUTENRIETH, 1996). Yersiniosen erreichen die dritthöchste Inzidenz der bakteriellen Enteritiden in Deutschland (RKI, 1999).

Als Symptome einer akuten Yersiniose können eine akute Enteritis, Enterocolitis, mesenteriale Lymphadenitis oder eine terminale Ileitis, abhängig vom Alter des Patienten, angesehen werden. Diese Erkrankungen stellen die Akutphase der Yersiniose dar, der als Komplikation verschiedene Krankheiten folgen können. *Y. enterocolitica* kann über mehrere Jahre hinweg in Lymphknoten und im darmassoziierten lymphatischen Gewebe persistieren und beim Patienten so zu chronischen und rezidivierenden Krankheitsverläufen führen (HOOGKAMP-KORSTANJE *et al.*, 1988; SEEBACHER *et al.*, 1982). Hierzu zählen Morbus Reiter, Erythema nodosum und die reaktive Arthritis. Bei Zerfall können Yersinien aufgrund ihres Zellwandaufbaus LPS freisetzen, dieses wirkt als Endotoxin und kann somit eine Schocksymptomatik auslösen (JACOBS *et al.*, 1989).

Die Kolonisation des Intestinaltrakts stellt das initiale Ereignis bei der Besiedelung des Darms dar. Zunächst müssen die Keime das Intestinallumen durchqueren, anschließend durchwandern sie die Mukusschicht über den mukosalen epithelialen Zellen, um dann an den Bürstensaumzellen zu adhären. *Y. enterocolitica* besiedelt das terminale Ileum und das proximale Kolon, die Mehrzahl der pathologischen Effekte und der klinischen Manifestationen finden dort statt. Hierzu bilden die Yersinien eine Vielzahl von Faktoren aus.

Das plasmidkodierte Yad A wird produziert und erfüllt mehrere Funktionen: Es bedeckt die Bakterienoberfläche, bindet an die Bürstensaumzellen speziell in der ileocaecalen Region des Darmes, weiterhin bildet es eine hydrophobe Oberfläche und autoagglutiniert bei 37 °C, zusätzlich vermittelt es die Adhärenz an HEp-2-Zellen (HEESEMANN u. GRÜTER, 1987).

Insgesamt gesehen ist Yad A verantwortlich für die bakterielle Adhärenz an den Mukus, in dem die Yersinien in der Lage sind, sich zu vermehren (PAERREGARD *et al.*, 1991). Die Eintrittspforte der Yersinien in das lymphatische System sind jedoch die M-Zellen der Peyer'schen Plaques. Die Peyer'schen Plaques sind Lymphfollikel im Ileum, sie bestehen aus M-Zellen und adsorptiven Zellen. M-Zellen sind spezialisierte Zellen im follikelassoziierten Epithel der Peyer'schen Plaques, sie sind Bestandteil des Immunsystems und stellen einen essentiellen Schritt in der Initiation des Immunsystems dar, indem sie der Aufnahme und dem Transport von Antigenen aus dem Darmlumen in das lymphatische Gewebe dienen.

Das Eindringen in die M-Zellen und die Vermehrung in den Zellen stellt ein multifaktorielles Geschehen dar (PEPE *et al.*, 1995; GRÜTZKAU *et al.*, 1990). Es wird durch die drei Invasionsgene vermittelt: *inv*, *ail*, *yad A*. Zur Invasion ist der *inv*-Locus notwendig, der für ein 103 kDa „outer membrane“-Protein kodiert (MILLER u. FALKOW, 1988; ISBERG u. FALKOW, 1985). Das Invasin bindet an den Integrinrezeptor von epithelialen Zellen und Yad A verstärkt die Adhäsion an eukaryonte Zellen (YANG u. ISBERG, 1993; BLISKA *et al.*, 1993; MILLER *et al.*, 1989; HEESEMANN u. GRÜTER, 1987; ISBERG und FALKOW, 1985). Unterstützt wird diese Aktion durch einen Faktor, der durch das *ail*-Gen kodiert wird.

Die Yersinien befallen vor allem die Peyer'schen Plaques im distalen Ileum und proximalen Kolon mit nachfolgenden Mikroabszessen, Ulzeration des darüber liegenden Epithels und einer inflammatorischen Reaktion (ROBINS-BROWNE *et al.*, 1985).

Plasmidkodierte Oberflächenkomponenten agieren als Phagocytoseschutz (LIAN *et al.*, 1987b), die plasmidtragenden Stämme können bei 37 °C Komponenten der äußeren Membran (= outer membrane protein = Yop) synthetisieren und sekretieren (MILLER u. FALKOW, 1988), und sich in der Lamina propria vermehren. Sechs Stunden nach oraler Aufnahme sind die plasmidkodierten Strukturen bei 37 °C voll exprimiert (LIAN *et al.*, 1987a). Sie stellen wichtige Virulenzfaktoren dar und sind sowohl Temperatur- (sie werden bei 37 °C gebildet), als auch Ca^{2+} reguliert. Bei Abwesenheit von Ca^{2+} bei 37 °C werden die Operons aktiviert. Weitere wichtige Faktoren sind das YopH zur Verhinderung der Phagozytose und das YopB, das die Bildung von Zytokinen und $\text{TNF}\alpha$ unterdrückt. Bei einem Temperaturshift von 25 °C auf 37 °C ändert sich zusätzlich die Zusammensetzung von Zuckern und Fettsäuren im LPS (WARTENBERG *et al.*, 1983).

Ebenso wirken die Effektorproteine YopE, YpkA, YopM der Phagocytose durch den Wirt entgegen und greifen in die Signaltransduktionswege der Zelle ein (FÄLLMANN *et al.*, 1997).

Die Yop-Proteine werden durch die Injektionsröhre eines Typ III-Sekretionsapparates direkt in das Cytosol der eukaryonten Zelle sekretiert. Nachdem die Infektion initiiert ist, spielt pYV die Hauptrolle im Infektionsgeschehen.

Virulente Yersinien nutzen zur Kolonisation des Organismus zunächst die bei niedrigen Temperaturen ausgebildeten, chromosomal kodierten Determinanten. Nach dem Temperaturshift im Wirtsorganismus werden die plasmidkodierten Proteine synthetisiert und sekretiert, um die Verteidigungsmechanismen des Wirtes, z.B. durch Phagozytose, zu umgehen (BOTTONNE, 1977).

In der Regel erfolgt die Infektion oral-alimentär, die Hauptquelle sind hierbei kontaminierte Lebensmittel, wobei die Palette von kontaminierten Fisch- und Milchprodukten über Wasser und Gemüse (bei Fäkaldüngung) bis hin zu Rohfleischprodukten reicht. Insbesondere das Schwein stellt ein epidemiologisch bedeutendes Erregerreservoir humanpathogener Yersinien dar (NATTERMANN *et al.*, 1994; KAPPERUD, 1991; WAUTERS, 1979), wobei die Infektion beim Schwein klinisch fast symptomlos ist und somit unerkannt bleibt.

Die Mehrheit der non-porcinen Isolate gehört zu den Biovar 1A-Umweltstämmen. Diese besitzen keine Virulenzfaktoren, sind äskulinpositiv (MILLER *et al.*, 1989) und können nicht in epitheliale Zellen invadieren (LEE *et al.*, 1977).

Jedoch in experimentellen Infektionsversuchen erkrankten die Schweine auch klinisch. Eine besondere Rolle bei der Infektion spielt das lymphatische Gewebe, zu dem der Erreger einen besonderen Tropismus zeigt: als Infektionspforte besitzt der lymphoretikuläre Rachenring eine besondere Bedeutung. Hier wiesen fast alle untersuchten Schweine eitrige Tonsillitiden mit starken lymphatischen Hyperplasien auf. Enteroinvasive *Y. enterocolitica*-Stämme überwinden die Darmepithelschranke, worauf der Wirt mit einer Hyperplasie der Peyer'schen Plaques reagiert (NATTERMANN, 1986). Die intrazelluläre Vermehrung führt zu ulzerierenden Schleimhautläsionen in erster Linie in Kolon, Caecum und Ileum. Im Anschluss an die Akutphase lässt sich in der Mehrzahl der Fälle auch eine Komplikationsphase in Form von Lahmheitserscheinungen durch degenerative Veränderungen der Gelenke, Hautveränderungen und Fruchtbarkeitsstörungen, bedingt durch die östrogenisierende Wirkung von *Y. enterocolitica*, feststellen. Bei Bekämpfung der *Y. enterocolitica*-Infektion in solchen Beständen geht die Verringerung der Keimzahl mit einer Verbesserung der Fruchtbarkeitsleistung einher (NATTERMANN, 1994). Insgesamt wird eine hohe Durchseuchungsrate der Schweinebestände festgestellt. Besonders hoch ist die Prävalenz bei Jungschweinen im Alter von 90-110 Tagen.

Es ist also erforderlich, zur Eindämmung des Infektionsweges Schwein - Mensch die Infektionskette zu unterbrechen, indem die *Y. enterocolitica*-Infektion in den Schweinebeständen möglichst ausgerottet wird. Aufgrund der sich weiter verschlechternden Antibiotikaresistenzlage und dem umstrittenen Einsatz von Antibiotika in der Tierzucht und Tiermast müssen neue Wege der Bekämpfung gefunden und beschritten werden. Um die weitere Ausbildung und Verbreitung von antibiotikaresistenten Stämmen möglichst zu vermeiden, bemüht man sich, alternative Wege zu finden und versucht andere von Mikroorganismen produzierte antimikrobielle Substanzen zu nutzen, die speziell auf den betreffenden Erreger zugeschnitten sind. Auch wurden in den letzten Jahren nur sehr wenige neue Antibiotika gefunden, die andere Wirkmechanismen als die bereits bekannten Antibiotika haben. Desweiteren ist zu beachten, dass die meisten der großen Zahl von Bakterien, die z.B. im Darm leben, nicht pathogen sind sondern, im Gegenteil, uns vor Pathogenen schützen. Die Auswirkung von Breitspektrum-Antibiotika auf diese nützlichen Kommensalen ist verheerend, denn auch sie werden abgetötet. Auch dies ist ein wichtiger Punkt, warum nur eng begrenzte bakterizide Agenzien eingesetzt werden sollten.

Die Verbreitung von antibakteriellen Substanzen bzw biologischen Wirkmechanismen ist ein weitverbreitetes Phänomen bei Prokaryonten. Hierbei reicht die Palette von Toxinen über bakteriolytische Enzyme, Nebenprodukte der primären metabolischen Stoffwechselwege bis hin zu Bakteriophagen und Bacteriocinen (RILEY, 1998).

2.3 Bacteriocine

Das steigende Interesse an den Bacteriocinen liegt vor allem in der großen Bacteriocindiversität und in der weiten Verbreitung der Bacteriocinproduktion im Bakterienreich. Sie werden in der Lebensmittelindustrie als Konservierungsmittel (DAVIES *et al.*, 1997) und in der Medizin in einigen Fällen als antibakterielle Wirkstoffe (STEVENS *et al.*, 1991; HOWELL *et al.*, 1993; BRAUDE u. SIEMIENSKI, 1968) genutzt.

Bacteriocine sind von Bakterien produzierte spezifische antibakterielle Substanzen, die Isolate nahe verwandter Spezies in ihrem Wachstum inhibieren oder abtöten (GOVAN, 1986; DYKES, 1995). Bacteriocine enthalten in der Regel hochmolekulare Proteine oder Peptide und unterscheiden sich von Antibiotika darin, dass sie ein sehr enges Wirkungsspektrum haben. Die Abtötung der Zelle erfolgt z.B. durch Bildung ionendurchlässiger Kanäle in der Zytoplasmamembran, durch unspezifische Degradation der Zell-DNA oder aber durch Inhibition der Proteinproduktion oder Peptidoglycansynthese (RILEY, 1998). Der

Produzentenstamm selbst besitzt eine spezifische Immunität gegen sein eigenes Bacteriocin und kann so nicht angegriffen werden. Kodiert ist der Phänotyp meist durch ein Cluster von eng verbundenen Genen, die die Information für das Bacteriocin selbst, das Immunitätsprotein und die Lysisfunktion tragen (RILEY, 1998).

Die Bacteriocinbildung erfolgt unter Streß, experimentell kann dieser durch UV-Licht (ISHII *et al.*, 1965) oder durch das Zellgift Mitomycin C (IIJIMA, 1962) hervorgerufen werden.

Die ersten Untersuchungen wurden 1925 von GRATIA an einem bacteriocinsensitiven Stamm von *Escherichia (E.) coli* durchgeführt. Er isolierte eine inhibitorische Substanz, die zunächst Prinzip V genannt wurde, heute heißt sie Colicin V. Diese Arbeiten wurden von Gratiass Schüler Fredericq fortgeführt, der heute als Begründer der Bacteriocinforschung gilt. Das Hauptinteresse galt zunächst den Colicinen, erst in späteren Jahren (ab 1960) wurden auch andere *Enterobacteriaceae* auf Bacteriocinproduktion untersucht. Nach wie vor sind die Colicine die bestuntersuchtete Gruppe der Bacteriocine (JAMES *et al.*, 1991; PUGSLEY, 1987; 1984; FREDERICQ, 1957).

Prinzipiell lassen sich nach BRADLEY (1967) bei gramnegativen Bakterien zwei Gruppen von Bacteriocinen unterscheiden:

Die erste Gruppe weist ein niedriges Molekulargewicht auf, ist nicht sedimentierbar in der Ultrazentrifuge, ist trypsinempfindlich, hitzestabil und lässt sich im Elektronenmikroskop nicht nachweisen.

Die zweite Gruppe zeichnet sich durch ein hohes Molekulargewicht aus, ist sedimentierbar, trypsinresistent, hitzeempfindlich. Grob lassen sich auch hier zwei Hauptgruppen festlegen: zum einen gibt es die großen Proteine mit einer Größe von 30 - 90 kDa, zu dieser Gruppe zählen die Colicine, zum anderen hat die Gruppe der partikulären Bacteriocine eine Größe von mehr als 10^7 Da. Die Gestalt reicht vom kompletten phagenähnlichen Partikel über inkomplette Phagen oder einzelne Phagenkomponenten. Vereinzelt können diese Partikel auch noch DNA enthalten.

Es existieren drei Gruppen von defekten Phagen (GARRO u. MARMUR, 1970):

1. Phagenpartikel, die wirtsspezifische DNA enthalten

Diese Phagenpartikel verpacken bereits existierende DNA des Wirtsbakteriums. Hierzu zählen die PBSX-Phagen von *Bacillus (B.) subtilis* (SEAMAN *et al.*, 1964) und der PBLB-

Phage von *B. licheniformis* (HUANG u. MARMUR, 1970). Sie bestehen aus langen kontraktile Schwänzen und kleinen Köpfen, die doppelsträngige DNA enthalten.

2. Phagenpartikel, die phagentypische DNA enthalten

Hierunter fallen die Phagen, die zwar keine Plaques produzieren können, die jedoch DNA verpacken, die für diese Phagen typisch ist und nicht zur Wirtszelle gehört. Dazu zählen der Phage PBLA, der von *B. licheniformis* produziert wird (HUANG u. MARMUR, 1970) und zwei Phagen, die von einigen Derivaten des *E. coli*-Stammes 15 produziert werden (FRAMPTON u. MANDEL, 1970). Diese defekten Phagen besitzen größere Kopfstrukturen als die Phagen der erstgenannten Gruppe (400 - 600 Angström).

3. Phagenschwanzähnliche Partikel

Die phagenschwanzähnlichen Partikel kommen am häufigsten auf den entsprechenden elektronenmikroskopischen Bildern vor und bestehen aus phagenschwanzähnlichen Strukturen (DAW u. FALKINER, 1996). Die bekanntesten Elemente aus dieser Gruppe sind die R-Typ Pyocine. Die phagenschwanzähnlichen Strukturen bestehen aus einer kontraktile Scheide (sheath) und einem zylindrischen Stift (core) (ISHII *et al.*, 1965), damit entsprechen sie dem Aufbau eines Phagenschwanzes. ITO *et al.* (1970) isolierten 4 R-Typ Pyocine aus verschiedenen *Ps. aeruginosa*-Stämmen. Die bakterizide Wirkung der Pyocine wird durch die Depolarisierung der Cytoplasmamembran der Zielzelle hervorgerufen (URATANI u. HOSHINO, 1984). Die Gene zur Pyocinsynthese liegen auf dem Chromosom und es wurde von NAKAYAMA *et al.* (2000) gezeigt, dass Pyocine eine gemeinsame ursprüngliche *ori*-Region mit Bakteriophagen besitzen. Tabelle 15 gibt einen Überblick über die Größenverhältnisse bei phagenschwanzähnlichen Partikeln.

Die defekten Phagen sind aus folgenden Gründen näher mit infektiösen Phagen verwandt als mit den colicinähnlichen Bacteriocinen:

Sie zeigen eine Komplexität der Struktur, sie besitzen die Fähigkeit zur Lyse infolge Induktion bzw. die Lyse von sensiblen Bakterienzellen. Der Rezeptor ist auf der Zellwand lokalisiert, sehr viel seltener auf der Zellmembran, weiterhin sind die genetischen Determinanten der defekten Phagen assoziiert mit dem Genom der betreffenden Bakterienzelle (GARRO u. MARMUR, 1970).

Bei grampositiven Bakterien entsprechen die Bacteriocine nicht der klassischen Definition (HAVARSTEIN *et al.*, 1994; STRASSER u. HANEA, 1993; TAGG *et al.*, 1976), da sie ein breiteres Wirtsspektrum aufgrund des anderen Zellwandaufbaus bei grampositiven Bakterien

aufweisen und ihre Wirkung nicht über Rezeptoren vermittelt wird, weiterhin wird ihre Abgabe durch Lysine unterstützt. (TAGG *et al.*, 1976). Es handelt sich hierbei um Peptidbacteriocine einer Größe von 2000 - 10000 Da. Insbesondere den Bacteriocinen der Milchsäurebakterien wird viel Beachtung geschenkt, da sie industriell als Konservierungsstoff für Nahrungsmittel genutzt werden (z.B. Nisin) (DAVIES *et al.*, 1997; DELVES-BROUGHTON, 1990). Ein weiteres Beispiel für komplexe Bacteriocine bei grampositiven Bakterien ist das Plantaricin S, sowie das Helveticin J, das als Stellvertreter für die großen, hitzelabilen Bacteriocine bei grampositiven Bakterien steht (DYKES, 1995).

In der vorliegenden Arbeit wende ich mich insbesondere einem Bacteriocin aus der Gruppe der phagenähnlichen Bacteriocine zu, bei denen es sich um defekte Phagen handelt.

Fundamentale Unterschiede existieren, auf welche Art die verschiedenen Bacteriocine die Zellwand ihrer Zielbakterien durchdringen. Da große Unterschiede im Zellwandaufbau zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien bestehen, müssen die Bacteriocine sehr unterschiedliche Strategien besitzen, um die jeweilige Zellwand schnell durchdringen zu können. So können kleine Peptide leicht die dicke Peptidoglycanwand der grampositiven Bakterien überwinden (z.B. Staphylococcin, das Bacteriocin von *Staphylococcus (St.) aureus* (SAHL, 1994)), durch die dünnere Peptidoglycanwand der gramnegativen Bakterien können größere Proteine rezeptorvermittelt hindurchgeschleust werden, wie z.B. die Colicine von *E. coli* (O'BRIEN *et al.*, 1994). Obwohl die Struktur der Bacteriocine so uneinheitlich ist, ist der Wirkmechanismus, über den sie ihre Wirkung entfalten, bei vielen Bacteriocinen erstaunlich einheitlich und einfach: Nachdem sie spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche erkannt haben, stören sie das Membranpotential (transmembrane proton motive force), indem sie Poren oder Ionenkanäle in die bakterielle Membran formen, und somit das Membranpotential zerstören und gleichzeitig der Zelle die Möglichkeit zur Energiegewinnung nehmen (DYKES, 1995; RILEY 1998). Andere wiederum wirken hemmend auf die Synthese der Nukleinsäuren, degradieren die Zell-DNA unspezifisch oder blockieren die Protein- bzw. die Peptidoglycansynthese der Zelle (RILEY, 1998).

Die genetischen Determinanten für die Bacteriocinproduktion liegen in den meisten Fällen auf Plasmiden vor, so zum Beispiel bei den Colicinen, und können häufig leicht durch Konjugation oder Transduktion auf kompatible Rezipientenstämme übertragen werden (DYKES, 1995). Auch andere mobile Elemente, wie Transposons, werden beschrieben (DYKES, 1995). In einigen Fällen liegt die Information jedoch auf dem Chromosom, wie zum Beispiel bei den Pyocinen der R-Klasse, den phagenschwanzähnlichen Bacteriocinen von *Ps. aeruginosa* (KAGEYAMA, 1975). Dort verankert liegen nicht nur die Strukturgene des

Pyocins sondern auch die Gene für die Regulation der Biosynthese, den Freisetzungsmechanismus und die spezifischen Faktoren, die dem Produzentenstamm zur Immunität gegen das von ihm gebildete Bacteriocin verhelfen. Das Immunitätsprotein interagiert normalerweise mit der C-terminalen Domäne des Bacteriocinproteins (RILEY, 1998). Der Export des Bacteriocins aus der Zelle ist abhängig von einem einzigen Gen, welches für das Bacteriocin Releasing Protein kodiert. Im Gegensatz dazu ist zur Freisetzung aller anderen von der Zelle produzierten Proteine ein Cluster von mindestens 3 aktiven Proteinen notwendig (DAW u. FALKINER, 1996).

Bereits in den fünfziger Jahren wurden Bacteriocine als klinisches Therapeutikum vorgeschlagen, doch erst in neuerer Zeit ist das Interesse durch die sich ständig verschlechternde Antibiotikaresistenzlage von neuem erwacht. Es wurden verschiedene Versuche mit Colicin als Therapeutikum durchgeführt, ebenso wurden Therapieversuche mit den verschiedenen Pyocinen in unterschiedlichen Anwendungen durchgeführt. SMITH und HUGGINS (1977) behandelten mit verschiedenen *E. coli*-Stämmen infizierte Mäuse mit Colicin V. In den ersten 12 Stunden nach der Infektion war die Mortalität der mit Colicin behandelten Mäuse geringer als die der Vergleichsgruppe, die mit Streptomycin behandelt wurden.

Mäuse konnten gegen eine letale Gabe von *Ps. aeruginosa* geschützt werden, indem ihnen eine Stunde vor der Infektion eine einzige Injektion eines Pyocins verabreicht wurde. Der protektive Effekt hielt mindestens vier Tage an (HAAS *et al.*, 1974).

2.4 Bakteriophagen

Neben den Bacteriocinen gibt es weitere Möglichkeiten, im therapeutischen Ansatz Bakterien selektiv zu bekämpfen. Eine Klasse spezifischer Wirkstoffe sind die Bakteriophagen.

Bakteriophagen sind Bakterienviren, die ausschließlich Bakterien infizieren und sich in diesen vermehren. Sie vermehren sich obligat intrazellulär, sie enthalten DNA oder RNA als genetisches Material und sind abhängig von den Stoffwechselleistungen der infizierten Zelle. Bei einer Infektion verbleibt das Kapsid außerhalb der Bakterienzelle und die Phagennukleinsäure wird per Injektionsnadel in die Bakterienzelle injiziert. Anschließend werden die Phagenbestandteile mit Hilfe des Bakterienstoffwechsels unter genetischer Kontrolle des Phagengenoms synthetisiert und zu kompletten Partikeln zusammengesetzt.

Sie werden entweder einzeln aus der Zelle ausgeschleust oder durch Lyse der Bakterienzelle freigesetzt (KLAUS *et al.*, 1992).

Phagen binden an spezifische Rezeptoren der Bakterienzelle, diese Rezeptoren dienen der Bakterienzelle selbst zur Adhäsion an andere Zellen, zur Porenbildung oder zur Ausführung ähnlicher Mechanismen. Bei entstehenden Resistenzen von Bakterien gegen Phagen ist häufig der Verlust des Rezeptors als Ursache anzusehen. Der Rezeptor kann aus Proteinen, Kohlenhydraten oder aus Bestandteilen der Lipopolysaccharide bestehen. Jede Bakterienart hat ihre eigenen Phagen, die Phagen sind ubiquitär verbreitet (KUTTER, 1997).

Edward Twort und Felix d'Herelle gelten als die Väter der Phagenforschung, sie berichteten bereits 1915 und 1917 unabhängig voneinander von „kleinen Partikeln, filtrierbar durch feinste Porzellanfilter, die Bakterienkulturen zerstören können“ und die in der Lage waren, „auf Bakterienrasen klare, begrenzte Flächen zu erzeugen“ (TOPLEY *et al.*, 1925). Bereits d'Herelle befasste sich mit der Möglichkeit, Phagen als natürliches Therapeutikum gegen Infektionskrankheiten zu verwenden. 1921 wurde erstmalig von einer erfolgreichen Phagentherapie berichtet, wobei Staphylokokkeninfektionen der Haut mit Bakteriophagen behandelt wurden (BRUYNOGHE u. MAISON, 1921). DUBOS (1943) gelang es zu zeigen, dass eine intraperitoneal verabreichte Phagensuspension in der Lage war, Mäuse vor dem tödlichen Verlauf einer *Shigella (Sh.) dysenteriae*-Infektion zu schützen. Weiterhin konnte er zeigen, dass die Phagen in der Lage waren, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.

Zwischen 1917 und 1956 herrschte großes Interesse an der Möglichkeit, Phagen als Therapeutikum einzusetzen. Dies führte jedoch häufig dazu, dass klinische Anwendungen erprobt wurden, ohne Detailwissen über die eingesetzten Phagen zu haben (SUMMERS, 2001). So wurden zum Beispiel unbekannte Phagen in unbekannten Konzentrationen ohne Kontrolle verwendet (SUMMERS, 2001). Auf diese Weise waren viele dieser Versuche von vornherein zum Scheitern verurteilt, da ohne Basiswissen über die Biologie und die grundsätzliche Natur der Phagen gearbeitet wurde. Es ist nicht verwunderlich, dass die Phagentherapie aufgrund dieser Mißerfolge negativ bewertet wurde und mit dem Aufkommen der neuen „Wunderwaffe“ Antibiotika wieder ad acta gelegt wurde.

Trotz all dieser negativ belegten Erkenntnisse können die positiven Eigenschaften der Phagen wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Phagen sind selbst-replizierende und selbst-limitierende Organismen, die sich so lange vermehren, wie ihnen sensitive Bakterien zur Verfügung stehen.

2. Sie sind wesentlich spezifischer als die meisten Antibiotika, somit schädigen sie auch nicht die normale Flora des Körpers, wie es bei den Antibiotika der Fall ist. Es wird nur die betreffende Bakterienspezies, die dem Phagen kompatibel ist, bekämpft. Gerade die Schädigung der normalen bakteriellen Besiedelung des Körpers führt leicht zu bakteriellen Sekundärinfektionen, die sehr schwer zu behandeln sind.
3. Es wurde kaum über Nebenwirkungen in der Phagentherapie berichtet.
4. Die Phagentherapie würde eine Alternative für Allergiker darstellen.
5. Eine prophylaktische Anwendung zum Schutz vor pathogenen Keimen ist möglich, so dass es gar nicht zum Ausbruch von Krankheiten kommt.
6. Phagenlysate können preiswert und vor Ort hergestellt werden.
7. Die Anwendung kann allein oder in Kombination mit Antibiotika erfolgen.

Durch ihre Fähigkeit zur Replikation reicht eine einzelne therapeutische Gabe der Phagen im Allgemeinen aus, um eine Infektion zu bekämpfen. In verschiedenen Therapieversuchen am Tier konnte gezeigt werden, dass sich die Phagen zwischen den einzelnen Tieren weiterverbreiten (SMITH u. HUGGINS, 1982) und sich somit eine prophylaktische Behandlung und die Behandlung von großen Herden einfach darstellen.

Um einer Resistenzentwicklung entgegen zu wirken, wendeten SLOPEK *et. al.* (1987) einen Phagencocktail an, wodurch bei einer entstehenden Resistenz gegen einen Phagen ein anderer seinen Rezeptor trotzdem erkennen und an seine Zielzelle andocken und lysieren kann. Auch sind die Phagen in der Lage solche Abwehrmechanismen, wie z.B. Mutation der Bakterienzelle oder Aufnahme von Plasmiden, zu überwinden (KLAUS, 1992)

Erst in den dreißiger Jahren stellte sich heraus, dass prinzipiell zwei Gruppen von Phagen, unabhängig ihres Aussehens, existieren: der lysogene Phage und der lytische Phage. Der lytische Phage infiziert die Bakterienzelle, stellt den bakteriellen Stoffwechsel nach seinen Bedürfnissen um, vermehrt sich und wird ausgeschleust, indem er die Zelle lysiert. Der lysogene Phage hingegen integriert seine DNA in die Wirtszelle als Prophage und kann dort über mehrere Generationszeiten hinweg ruhen, indem er einen Repressor synthetisiert, der das weitere Ablesen seiner Gene verhindert. Der Prophage kann auch wieder in den lytischen Zyklus eintreten, schneidet seine DNA aus dem Bakteriengenom und wird nach der Vermehrungsphase durch Lyse der Bakterienzelle freigesetzt. Hierbei kann es passieren, dass der Phage DNA aus der Wirtszelle mitausschneidet und sie verpackt. So kommt es zur Transduktion, bei der es zum Austausch von bakteriellem genetischem Material, zum horizontalen Gentransfer kommt. Allerdings eignen sich lysogene Phagen nicht zum Therapieansatz.

Es bedurfte erst einiger weiterer Entwicklungen, um das Wissen über die Phagen und ihren Wirkungsmechanismus zu verbessern. Hierzu zählen die bessere Aufreinigung und Konzentrierung über Ultrazentrifugation, die Entwicklung der Elektronenmikroskopie und damit die Möglichkeit, die Phagen sichtbar zu machen. Daraufhin war es möglich, die Phagen systematisch zu klassifizieren, und man erkannte, dass jeder Phage seine unverwechselbare Gestalt hat. (ACKERMANN u. DUBOW, 1987; RUSKA, 1940; PFANNKUCH *et al.*, 1940; SCHLESINGER, 1933).

Unter Max Delbrück und seinen Mitarbeitern Alfred Hershey und Salvador Luria wandelte sich die Phagenforschung in den westlichen Ländern in die Richtung, dass Phagen nun zur Klärung der Konzepte mikrobieller Zellregulation auf molekularer Basis genutzt wurden (KUTTER, 1997). Gegenstand dieser Forschung war die Familie der T-Phagen, die eine Schlüsselrolle in der Aufklärung der Überlebensstrategie der Viren spielte. Aufgrund dieses starken Fokus wurde wenig Wert auf Studien, die die Eigenschaften des Phagen in natürlicher Umgebung betrafen oder auch die Beschreibung von anderen Phagen, gelegt. Auch konnten die Phagen den schlechten Ruf, den sie durch die wenig bis unkontrollierten Versuche in der Frühzeit nach ihrer Entdeckung erworben hatten, nur schwer wieder ablegen.

Jedoch in Osteuropa und den Staaten der ehemaligen Sowjetunion wurden immer wieder Versuche zur Phagentherapie unternommen. In der polnischen Gruppe um Slopek wurden Therapieversuche an Patienten unternommen, die an Septikämien, suppurativen Fisteln, Abszessen, suppurativen Bronchopneumonien und purulenter Peritonitis erkrankt waren. Die Behandlung mit allen Antibiotika, die verfügbar waren, blieb erfolglos. Die Phagen wurden in Form von Cocktails auf unterschiedlichste Art und Weise appliziert und es wurde von erstaunlichen Heilungserfolgen von bis zu 92 % berichtet (SLOPEK *et al.*, 1987 a +b, WEBER-DABROWSKA *et al.*, 2000, 1987). Nachgewiesen werden konnte, dass die Phagen aus dem Verdauungstrakt überall in den Körper gelangen können und sich dort vermehren, wo immer sie ihre Wirtsbakterien antreffen (REYNAUD *et al.*, 1992).

In Tiflis, Georgien wurden Phagenpräparationen vor dem Niedergang der Sowjetunion industriell hergestellt und gehörten zum Standardprogramm der Bekämpfung von Infektionen. Es wurden riesige Mengen von unterschiedlichen Bakteriophagen gereinigt und charakterisiert. Von 1983 - 1985 wurden 2000 Staphylokokkenstämme, 1000 Streptokokkenstämme, 300 Proteusstämme und 380 Pseudomonasstämme auf Phagen und ihre Eigenschaften untersucht (KUTTER, 1997). Jedoch wurde bislang nur sehr wenig über Anwendung und Heilungserfolge publiziert. Mit dem Niedergang der Industrie in Georgien lassen sich jetzt nur noch unter sehr erschwerten Umständen weitere Forschungen und die

industrielle Herstellung des Phagenscocktails durchführen. Es sollen zwar Publikationen in Vorbereitung sein, diese sind bislang noch nicht erschienen.

In den westlichen Ländern flackerte das Interesse an Phagentherapie in den achtziger Jahren mit der ansteigenden Resistenzbildung vieler Keime wieder auf, und es wurden in Tierexperimenten vielversprechende Ergebnisse erzielt (ALISKY *et al.*, 1998; BARROW u. SOOTHILL, 1997; LEDERBERG, 1996).

So wurden bei systemischen *E. coli*-Infektionen sowohl im Mausmodell als auch bei einem Infektionsversuch mit Kälbern (SMITH u. HUGGINS, 1987 a+b; 1983; 1982) gute Heilungserfolge erzielt. Im Mausmodell konnte die Infektion mit Phagen, die gegen das K1-Kapselantigen gerichtet waren, sogar besser bekämpft werden als mit den herkömmlichen Antibiotika, einschließlich Streptomycin, Tetracyclin, Ampicillin und Trimethoprim/Furazolon. Die Kälber konnten durch prophylaktische Gabe eines Phagengemisches vor *E. coli*-Infektionen geschützt werden; wurde erst eine therapeutische Dosis mit dem Auftreten der ersten Symptome verabreicht, so konnte zwar kein vollständiger Schutz, dafür aber eine wesentlich milder verlaufende Infektion beobachtet werden. Ähnliche Erfolge können BERCHIERI *et al.* (1991) mit Versuchen an *S. Typhimurium*-infiziertem Geflügel für sich verzeichnen. Die *Salmonella*-Phagen wurden oral verabreicht und die Mortalität konnte von 60 auf 3 % gesenkt werden.

SOOTHILL (1994) berichtete über den Effekt von *Ps. aeruginosa*-Phagen, die er bei Verbrennungspatienten anwendete. Er zeigte am Meerschweinchen-Modell, dass der Phage vor Abstoßungsreaktionen bei Hauttransplantaten durch *Pseudomonas*-Sekundärinfektionen schützt. Weiterhin konnte er zeigen, dass bei systemischen Infektionen mit *Ps. aeruginosa* und *Acinetobacter (Ac.) baumannii*, wie sie bei Verbrennungsopfen häufig vorkommen, bereits mit geringen Phagendosen gegen LD 50-Konzentrationen angeköpft werden konnte (SOOTHILL *et al.*, 1992).

All diese Therapieansätze zeigen vielversprechende Hinweise auf die mögliche Nutzung von selektiver Infektionsbekämpfung im lebenden Organismus, wenngleich noch zahlreiche Untersuchungen bis zur konkreten Nutzbarkeit gemacht werden müssen. Diese Arbeit befaßt sich mit der Suche nach Alternativmöglichkeiten, *Y. enterocolitica* selektiv aus dem Organismus zu eliminieren und damit einen Therapieerfolg zu erzielen.

3 Material und Methoden

3.1 Bakterienstämme und Stammhaltung

3.1.1 *Y. enterocolitica* 29930

Der Stamm besitzt zwei Plasmide, das größere Plasmid hat eine Größe von ca. 58 kbp, das kleinere hat eine Größe von 5,2 kbp. Es handelt sich um ein Lebensmittelisolat der Serogruppe O:7,8 (Herkunft: FU Berlin, FB Veterinärmedizin) und gehört zum Biovar 1A. Stämme dieses Biovars gelten als apathogen.

3.1.2 *Y. enterocolitica* 13169

Dieses Isolat stammt aus dem Schwein (FU Berlin), es handelt sich hierbei um den enterocoliticin-sensitiven Indikatorstamm. Es gehört dem Serovar O:3 und dem Biovar 4 an.

3.1.3 *E. coli* XL1-Blue MR

Genotyp: D(*mcr A*) Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*) 173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA 1 lac^c*
Dieser Stamm wurde zur Infektion von Lambda-Partikeln verwendet, die zuvor ein Ligationsgemisch bestehend aus dem Vektor Supercos 1 und genomischer DNA aus dem Stamm *Y. enterocolitica* 29930 verpackt hatten.

Alle erwähnten Stämme wurden mit dem MicrobankTM System (PRO-LAB Diagnostics, UK) archiviert. Die Bakterien werden an Keramikkügelchen gebunden und bei –20 °C aufbewahrt bei Bedarf erfolgt ein Verdünnungsausstrich auf LB-Agarplatten.

Die Stämme wurden, soweit nicht anders erwähnt, ausgehend von Einzelkolonien, auf LB-Agarplatten oder in LB-Flüssigmedium angezüchtet. Die Inkubation der *Yersinia*-Stämme erfolgte bei 28 °C, die der *E. coli*-Stämme und Cosmide bei 37 °C.

3.2 Vektoren

3.2.1 Supercos 1

Der Cosmid-Vektor SuperCos 1 (Stratagene, LaJolla, USA) hat eine Größe von 7,9 kbp. Er verfügt sowohl über ein Ampicillinresistenzgen als auch über ein Neomycinresistenzgen. Er wird zur Amplifizierung und Expression von Cosmidklonen in eukaryonten und prokaryonten Zellen eingesetzt. (Vektorkarte siehe Anhang)

3.3 Nährmedien, Chemikalien

Alle Chemikalien, sofern nicht anders erwähnt, stammen von der Firma Merck, Darmstadt. Die Restriktionsenzyme stammen von der Firma MBI Fermentas, St. Leon-Rot.

3.3.1 Luria-Bertani (LB)-Medium (SAMBROOK *et al.*, 1989)

10 g Bacto-Trypton

5 g Bacto-Hefeextrakt

10 g NaCl

ad 1000 ml aqua bidest., pH 7,0, autoklaviert

Zur Herstellung fester Nährböden werden pro Liter LB-Medium 15 g Agar-Agar zugesetzt.

Die Anzucht der Kulturen erfolgt sowohl auf LB-Agarplatten als auch in LB-Flüssigmedium.

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 28 °C, wobei die Flüssigkulturen auf einem Rundschüttler bei 200 rpm geschüttelt wurden.

3.3.2 M9 Minimalmedium

6,0 g Na_2HPO_4

3,0 g NH_4Cl

0,5 g NaCl

ad 1000 ml aqua bidest.; pH 7,5

Autoklavieren 20 min bei 121 °C, nach dem Autoklavieren wurden 2 ml/l einer 1 M MgSO_4 -Lösung und 0,1 ml/l einer 1 M CaCl_2 -Lösung steril zugesetzt.

3.3.3 MOX-Agar

Zu 200 ml festem LB-Medium wurden nach Auflösen 0,5 M Na-oxalat und 0,25 M MgCl_2 (jeweils Endkonzentration) hinzugefügt und Platten gegossen.

3.3.4 CIN-Agar (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar nach Schiemann)

29 g Yersinia-Agar-Basis (Oxoid, Wesel)

ad 500 ml aqua bidet.

Autoklavieren 15 min bei 121 °C

Yersinia-Selektiv-Supplement (7,5 mg Cefsulodin, 2,0 mg Irgasan, 1,25 mg Novobiocin) wurden in 2 ml sterilem Aqua bidest und 1 ml Ethanol gelöst und steril zu der gelösten und autoklavierten Yersinia-Agar-Basis zugefügt.

Dieser Nährboden hat eine hohe Spezifität für die Gattung *Yersinia*, Irgasan hemmt das Wachstum gramnegativer Keime und Cefsulodin hemmt *Ps. aeruginosa*. Die Yersinien fermentieren das zugesetzte Mannit und der Indikator Neutralrot färbt das Koloniezentrum rot, die Kolonienoberfläche erscheint feingranuliert und nicht irrisierend ("kuhaugenförmige" Kolonien).

3.3.5 SOC-Medium

20 g Bacto-Trypton

5 g Bacto-Hefeextrakt

0,5 g NaCl

ad 950 ml aqua bidest.

Nach gründlicher Durchmischung werden 10 ml 250 mM KCl dazu gegeben und mit 5 N NaOH auf einen pH von 7,0 eingestellt.

Die Lösung wurde auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert, anschließend wurde sie auf 60 °C abgekühlt und es wurden 20 mM Glucose (sterilfiltriert, Filter mit Porengröße 0,2 µm, Schleicher und Schuell, Dassel) zugefügt.

3.4 Test auf das Vorhandensein des Virulenzplasmids bei *Y. enterocolitica* 13169

Eine verdächtige Einzelkolonie wurde mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %) abgeschwemmt. In einer dekadischen Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-5} wurden auf Calciummangelmedium (= MOX) jeweils 100 µl der Verdünnungsreihe ausplattiert. Es wurde eine Platte bei 28 °C und eine Platte bei 37 °C 48 h inkubiert. Virulente Yersinien zeigen auf Calciummangelmedium bei 37 °C ein vermindertes Wachstum, daher wurde eine kleine Kolonie von der 37 °C-Platte abgeimpft und bei 28 °C in LB-Flüssigmedium bis zu einer OD von 0,5 auf einem Rundschüttler bei 28 °C inkubiert.

Ca²⁺-Mangelmedium:

LB-Flüssigmedium wurde 20 mM MgCl₂ und 20 mM Na-Oxalat (jeweils Endkonzentration) zugesetzt.

Bei Erreichen der entsprechenden OD wurde ein Temperaturshift auf 37 °C vorgenommen. Hierdurch wurde die YOP-Synthese angeschaltet und ein Proteinring bildete sich an der Röhrchenwand. Zur Kontrolle diente ein Röhrchen, das weiterhin bei 28 °C bebrütet wurde, hier bildete sich kein Proteinring

3.5 Herstellung von Enterocoliticin

3.5.1 Produktion im 2,4 l Maßstab

Zunächst wurde eine Vorkultur angelegt, indem man 5 ml LB-Flüssigmedium mit *Y. enterocolitica* 29930 beimpfte und diese bei 28 °C, 180 rpm über Nacht auf einem Rundschüttler inkubierte. Von dieser Vorkultur wurde 1 ml in 100 ml LB-Flüssigmedium überimpft und für 6 h bei 28 °C inkubiert (Rundschüttler 180 rpm). Danach wurden die Zellen abgeerntet (Sigma Zentrifuge, Rotor 19776 (Sigma, Osterode/Harz), 4 °C, 4000 rpm, 5 min). Das Pellet wurde resuspendiert in 10 ml M9 + 1 % Glucose-Medium und in 790 ml M9 + 1 % Glucose-Medium in einem 3 l Erlenmeyerkolben überführt. Die Inkubation erfolgte zunächst für 1 h bei 20 °C unter mäßigem Rühren, danach wurde zur Induktion der Enterocoliticinproduktion Mitomycin C in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugefügt. Die weitere Inkubation erfolgte für 14 h bei 20 °C unter mäßigem Rühren.

Die Kulturen wurden abzentrifugiert (10.000 rpm, Sorval Rotor SLA 1500, Sorval, Hanau), 30 min bei 4 °C, der Überstand wurde dekantiert und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde zunächst durch einen 0,45 µm Filter (Sartorius, Göttingen) und anschließend durch einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert.

3.6 Reinigung des Enterocoliticin

3.6.1 Zentrifugation

Das Kulturfiltrat wurde mit 45.000 rpm (= 235.000 x g, Beckman Rotor TI 45, Beckman, Unterschleißheim) in der Ultrazentrifuge 2 h bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde dekantiert, das Pellet wurde mit dem im Röhrchen verbliebenen Rest resuspendiert. Die Schichtung des CsCl-Gradienten erfolgte laut Abbildung (Abb. 1). Der Gradient wurde mit den vereinigten resuspendierten Pellets überschichtet und zentrifugiert (28.000 rpm = 141.370 x g, Beckman Rotor SW 28, 16 h, 10 °C). Die entstandene milchig-weiße Bande wurde durch seitliches Einstechen einer Kanüle mit einer Spritze abgesaugt.

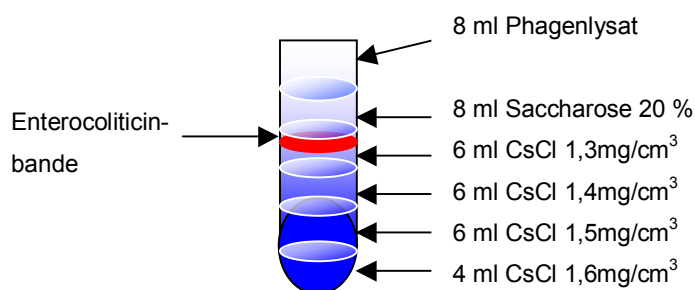


Abbildung 1 Schichtung des CsCl-Gradienten

Das so gewonnene Konzentrat wurde in einen Dialyseschlauch (Serva, Heidelberg) überführt und über Nacht gegen Aqua bidest dialysiert, anschließend wurde nochmals sterilfiltriert. (Porengröße 0,2 µm, Schleicher und Schuell, Dassel) und die Aktivität mittels Softagar-Overlaytest bestimmt (Methode siehe Punkt 3.7).

3.6.2 Reinigung über FPLC/Gelfiltration

Es wurde eine weitere Einengung des Konzentrates um den Faktor 2 durch Einengen durchgeführt, anschließend erfolgte ein Gelfiltrationslauf mittels einer FPLC-Anlage (ÄKTA Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) über eine Sephacryl 400 HR 10/30 Gelfiltrationssäule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

Das Trennungsprinzip der Gelfiltration beruht auf dem Größenunterschied zwischen den einzelnen Molekülen, es können so auch empfindliche Proteine ohne Beschädigung getrennt werden. Das System besteht aus einer flüssigen Phase und einer festen Phase, der Gelmatrix. Die Gele bilden ein dreidimensionales Netzwerk aus porösen Kugeln. Die Poren im Gel sind mit der flüssigen Phase gefüllt.

Als Elutionsmittel wurde ein ALEX-Puffer pH 8,0 benutzt, es wurden Fraktionen zu je 2 ml gesammelt, die auf Aktivität mittels Softagar-Overlaytest überprüft wurden. Die aktivsten Fraktionen wurden weiter verwendet bzw. mittels SDS-PAGE (siehe 3.10) analysiert.

ALEX-Puffer

0,07 M Bis-Tris, 0,05 M Tris wurden mit 1000 ml A. bidest aufgefüllt und mit HCl 36 % auf einen pH von 8,0 eingestellt.

3.7 Aktivitätstest für das Enterocoliticin (Lysat-Technik nach FALKINER u. KEANE, 1977)

3.7.1 Herstellen von Softagar 0,7 %

Zu 200 ml flüssigem LB-Medium werden 1,4 g Agar-Agar zugegeben. Durch Aufkochen des Mediums wurde der Agar gelöst. Aufbewahrt wurde der Softagar im 60 °C Wasserbad, vor Benutzung wurde er auf 42 °C heruntergekühlt.

3.7.2 Gießen der Softagar-Overlayplatten

Ein Teil Softagar (ca. 50 ml) wurde portioniert und auf 42 °C im Wasserbad abgekühlt. Es wurden 50 µl Glycerolkultur *Y. enterocolitica* 13169 nach gründlicher Durchmischung zugefügt und die Suspension ebenfalls gründlich durch Schütteln gemischt. Die

vorgewärmten und vorgetrockneten LB-Agarplatten wurden mit ca. 4 ml Softagar überschichtet, der durch Umschwenken gleichmäßig verteilt wurde.

Die Lagerung der Softagar-Overlayplatten erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C für maximal 3 Tage.

3.7.3 Aktivitätstest nach FALKINER u. KEANE (Softagar-Overlaytest)

Die Quantifizierung der biologischen Aktivität erfolgte im Spotttest. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe (Verdünnungsschritte 1:4 oder 1:2) hergestellt. Als Verdünnungsmedium diente Aqua bidest (NGUYEN, 1999; BENKERROUM *et al.*, 1993). Es wurden 20 µl jeder Verdünnungsstufe auf den Softagar-Overlay aufgetropft, als Positivkontrolle diente eine bereits bekannte Enterocoliticinpräparation, die ebenfalls aufgetropft wurde. Man ließ die Platten trocknen und inkubierte sie anschließend bei 28 °C oder bei 37 °C für 14 h.

Die Verdünnung, die am nächsten Tag noch einen erkennbaren Wachstumshemmhof zeigte, ergab die relative Aktivität des Enterocoliticans in activity units (AU) an (Abb. 2).



Abbildung 2 Aktivitätstest nach Falkiner und Keane
letzter erkennbarer Hemmhof liegt bei 4^{-5}

Die Berechnung der Aktivität pro ml erfolgte folgendermaßen:

Beispiel: letzter erkennbarer Wachstumshemmhof bei 4^{-5} => reziproker Wert 4^5 , das entspricht 1024 activity units in 20 µl. Hieraus ergibt sich: $1024 \times 50 = 51.200$ activity units/ml.

3.8 Restriktionsverdau

Als Restriktion wird der durch Restriktionsendonucleasen katalysierte Abbau von DNA bezeichnet. Diese Enzyme erkennen eine bestimmte DNA-Sequenz und schneiden entweder in dieser Erkennungssequenz oder in benachbarten Regionen. Für die Gentechnik sind die Typ II-Restriktionsendonucleasen von großer Bedeutung. Sie erkennen und schneiden die DNA innerhalb einer Erkennungssequenz, die in der Regel 4 bis 8 Basenpaare lang ist. Bei diesen Erkennungsregionen handelt es sich meistens um Palindromstrukturen. Es entstehen Fragmente von definierter Größe, deren Enden je nach Enzymart entweder glatt (blunt-ends) oder kohäsiv (sticky-ends) sein können.

Der DNA-Restriktionsverdau wurde mit verschiedenen Enzymen (Tab.1) durchgeführt, wobei die von den Herstellern empfohlenen Bedingungen eingehalten wurden. Der Verdau erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl bis maximal 200 µl. Pro Ansatz wurden 30 – 200 ng DNA und 8 - 12 U der Restriktionsendonuclease eingesetzt. Die optimale Salzkonzentration wurde durch die Zugabe der entsprechenden Menge an 10 x Enzympuffer, der vom Hersteller geliefert wird, erreicht. Die Inkubationstemperatur richtete sich nach dem Temperaturoptimum des eingesetzten Enzyms. Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden. Die gespaltene DNA zeigt im Agarosegel ein reproduzierbares Restriktionsmuster.

Tabelle 1 Benutzte Restriktionsenzyme

Enzym	Schnittstelle	Inkubationstemperatur
<i>Sau3a</i>	↓GATC	37 °C
<i>XbaI</i>	T↓CTAGA	37 °C
<i>BsuRI</i>	GG↓CC	37 °C
<i>HindIII</i>	A↓AGCTT	37 °C
<i>EcoRI</i>	G↓AATTC	37 °C
<i>BamHI</i>	G↓GATCC	37 °C

3.9 Erstellung einer Cosmidgenbank

Zur Erstellung einer Genbank von *Y. enterocolitica* 29930 wurde ein Cosmid genutzt, das sowohl Anteile aus der DNA von Plasmiden als auch die *cos*-Stelle aus dem lambda-Genom enthält, die im Phagengenom als Verpackungssignal dient. Zusätzlich trägt der Cosmid-Vektor zwei Resistenzgene (siehe Anhang). Dieser Vektor erlaubt den Einbau sehr langer

DNA-Stücke, wodurch das Screening des Genoms von *Y. enterocolitica* 29930 erleichtert wird.

3.9.1 Partialverdau

Zunächst erfolgte ein partieller Verdau der Gesamt-DNA von *Y. enterocolitica* 29930 und die Isolierung hochmolekularer Fragmente.

Um die optimale Enzymkonzentration für den gewünschten Partialverdau des Gesamtgenoms aus *Y. enterocolitica* 29930 zu ermitteln, wurde eine Verdünnungsreihe des Restriktionsenzym *Sau3a* hergestellt.

Zur Ermittlung der benötigten Menge des Restriktionsenzym *Sau3a* wurden 10 µg DNA von *Y. enterocolitica* 29930 eingesetzt. Es wurden 10 Eppendorf-Gefäße auf Eis vorgekühlt. Es wurde in jedes Reaktionsgefäß jeweils die gleiche Menge DNA vorgelegt. In das erste Gefäß wurde 1 µl *Sau3a* dazupipettiert. Nach gründlicher Durchmischung wurde jeweils 1 µl in das nächste Gefäß überführt und so eine Verdünnungsreihe des Restriktionsenzym *Sau3a* erstellt. Es wurde 10 min bei 37 °C inkubiert, nach Abstoppen der Reaktion im 65 °C Wasserbad wurden die einzelnen Fraktionen auf einem 0,6 %igen Agarosegel überprüft, um die optimale Enzymmenge für den gewünschten Partialverdau zu ermitteln. Die verwendeten Enzymkonzentrationen betrugen von 10^0 bis 10^{-9} , als Kontrolle diente unverdaute Gesamt-DNA von *Y. enterocolitica* 29930. Der später verwendeter Ansatz setzte sich wie folgt zusammen: 100 µg Gesamt-DNA, 80 µl Puffer (10-fach), 0,5 bzw 1 µl Enzym, somit ergab sich ein Gesamtvolumen von 881 µl. Die gemessene Konzentration der verwendeten DNA betrug 42 ng/ml. Die Schnittstelle für *Sau3a* (= *Bsp143*) ist GATC (siehe Tab. 1).

Zur möglichst exakten Bestimmung der Fragmentlänge der partiell verdauten DNA werden besondere Elektrophoresebedingungen gewählt: eine Agarosekonzentration von 0,6 %, geringe Spannung (25 V pro 20 cm Laufstrecke), lange Laufzeit über Nacht (Spannungsgerät: Power Rack P25, Biometra, Göttingen, Gelkammer: Agagel Maxi, Biometra, Göttingen)

3.9.2 Saccharosegradient

Um die einzelnen Fragmente des Partialverdaus mit *Sau3a* nach ihrer Größe bzw. Dichte zu trennen, mußten sie einen Saccharosegradienten durchlaufen.

10 % Saccharoselösung

10 g Saccharose

5,8 g NaCl = 1M NaCl

4,8 g Tris = 20 mM Tris

0,19 g EDTA = 5 mM EDTA

mit HCl w=37 % auf pH 7,5 einstellen

mit A.bidest. auf jeweils 100 ml auffüllen.

40 % Saccharoselösung

40 g Saccharose

5,8 g NaCl = 1M NaCl

4,8 g Tris = 20 mM Tris

0,19 g EDTA = 5 mM EDTA

mit HCl w=37 % auf pH 7,5 einstellen

Der Gradient wurde mit einem Gradientenmischer (Beckman, Unterschleißheim) in einem Beckman-Zentrifugationsröhrchen hergestellt. Die Zentrifugation erfolgte in einer Beckman Ultrazentrifuge mit dem Rotor SW 41, bei 20 °C, 16 h. Am Ende des Zentrifugenlaufs wurde möglichst langsam abgebremst, um Verwirbelungen zu vermeiden.

Der Gradient hatte ein Volumen von 12 ml, darauf wurden 0,8 ml Partialverdau Gesamt – DNA *Y. enterocolitica* 29930 aufgetragen, die zuvor 5 min auf 65 °C erhitzt wurde, um etwaige Aggregate zu zerstören.

3.9.3 Austropfen des Gradienten

Nach Beendigung der Zentrifugation wurde das jeweilige Zentrifugenröhrchen mit Parafilm verschlossen und von unten mit einer Kanüle angestochen und der Gradient wurde so zu einzelnen Fraktionen ausgetropft, dass in jedes Reaktionsgefäß ca. 750 µl gefüllt wurden (siehe Tab. 2).

Tab 2: ausgetropfte Gradienten

Gradient	Enzymmenge	Fraktionsanzahl	Fraktionsgröße
Gradient 1	0,25 µl	13	750 µl
Gradient 2	0,5 µl	16	750 µl
Gradient 3	0,5 µl	16	750 µl
Gradient 4	1 µl	14	750 µl

Die einzelnen Fraktionen (Tab. 2) wurden auf ein 0,6 % Agarosegel aufgetragen, um die Größe der einzelnen Fragmente zu überprüfen.

3.9.4 Überprüfung der gefällten Saccharosegradient-Fragmente aus dem Saccharosegradienten

Um die Konzentration der aufgetrennten DNA-Fragmente zu erhöhen, wurden diese mit kaltem Ethanol gefällt. Zu 180 µl Fragment wurden 320 µl H₂O und 1000 µl Ethanol hinzupipettiert, dies ergab ein Gesamtvolumen von 1500 µl. Die Fällung der Fragmente erfolgte über Nacht bei -20 °C.

Die Fragmente wurden in der Eppendorff Tischzentrifuge 5415D (Eppendorf, Hamburg) 20 min bei 14.000 rpm präzipitiert, danach wurde der Ethanolüberstand dekantiert, Ethanolreste wurden im Brutschrank bei 37 °C abgedampft.

Anschließend wurde die gefällte DNA in 25 µl TE-Puffer aufgenommen. Es wurde eine Agarosegelelektrophorese zur Überprüfung der Fragmentgröße und der DNA-Konzentration durchgeführt.

Vier Fraktionen mit der DNA der gewünschten Fragmentgröße wurden jeweils zusammengeführt.

TE - Puffer pH 8,0

10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1mM EDTA (pH 8,0) wurden in A. bidest gelöst.

3.9.5 Transformation des Vektors Supercos in *E.coli* XL1-Blue MR

Zur Transformation von *E. coli* werden kompetente Zellen benötigt. Diese werden durch Behandlung mit CaCl₂ hergestellt und haben die Eigenschaft, DNA aus dem umgebenden Milieu aufzunehmen.

3.9.5.1 Herstellung kompetenter Zellen von *E.coli* XL1-Blue MR

Über Nacht wurde eine Vorkultur in LB-Flüssigmedium angezüchtet. Am nächsten Morgen wurden 4 ml Vorkultur in 100 ml LB angeimpft, die bis zur OD₅₈₀ 0,5 wuchs. Es wurden 2 mal 15 ml Kultur in auf Eis vorgekühlte Zentrifugenbecher gefüllt und zentrifugiert bei 4 °C, 6000 rpm, 5 min (Sorvall, SLA Rotor). Das Pellet wird in 0,5 ml 50 mM CaCl₂ bei 4 °C resuspendiert (1/2 Volumen) und anschließend 30 min stehen gelassen. Anschließend

wurde erneut 5 min bei 4 °C und 7000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl (1/10 Volumen) 50 mM CaCl₂ resuspendiert und auf Eis stehen gelassen.

3.9.5.2 Transformation

Der Cosmidvektor SuperCos 1 (Stratagene, La Jolla, USA) hat eine Größe von 7,9 kbp. Er enthält sowohl ein Ampicillinresistenzgen als auch ein Neomycinresistenzgen.

Von der Supercos-Plasmid DNA wurde 1 µl mit 200 µl kompetenten Zellen von *E. coli* XL1-Blue MR zusammengebracht und 30 min im Eisbad inkubiert. Anschließend wurde 3 min bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Es wurde 1 ml SOC-Medium zugegeben und 60 min bei 37 °C weiter im Wasserbad inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf Selektionsplatten (LB + Ampicillin, 100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.9.6 Plasmidisolierung aus transformiertem *E.coli* XL1-Blue MR

Zur Überprüfung der Cosmide wurde eine Plasmidisolierung aus den transformierten *E. coli* XL1-Blue MR-Kolonien durchgeführt. Hierzu wurde jeweils eine Kolonie gepickt und über Nacht in 6 ml LB-Medium angezüchtet.

Die Plasmidisolierung wurde mit einem Kit (NucleoSpin® Plus Minipreps, Clontech Laboratories, Palo Alto, USA) durchgeführt und erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers (siehe Anleitung).

3.9.7 Präparation Vektor-DNA für Supercos-Ligation

Die Präparation der Vektor-DNA erfolgte nach Empfehlung des Herstellers (Stratagene, La Jolla, USA)

Durch einen Restriktionsverdau wurde die Vektor-DNA linearisiert, mit den entsprechenden Enzymen wurde die zu klonierende DNA verdaut, um entsprechende kompatible Enden zu erhalten.

Die Vektor DNA wurde zunächst mit dem Restriktionsenzym *Xba*I verdaut, im Anschluß daran mit CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)) 30 min bei 37 °C dephosphoryliert. Gestoppt wurde die Reaktion wie folgt: Das gleiche Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol wurde zum Ansatz hinzugegeben und 15 min in einer

Tischzentrifuge (Eppendorf) bei 13.200 rpm zentrifugiert. Die Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das gleiche Volumen Chloroform hinzugefügt, gemischt und 15 min zentrifugiert. Die Oberphase wurde erneut in neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1/10 Volumen Na-acetat (3 M), sowie 2,5 Vol eiskaltem Ethanol (70 %) versetzt, 30 min bei 0 °C inkubiert und 30 min bei 4 °C zentrifugiert (20000 rpm, Rotor 12154, Sigmazentrifuge 3K30, Sigma, Osterode/ Harz). Danach wurde der Überstand abgegossen, und das Pellet getrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und anschließend die so behandelte Vektor-DNA mit *Bam*HI weiterverdaut.

3.9.8 Ligation Supercosvektor und Fragmente

Bei der Ligation wird ein fremdes DNA-Fragment (= Insert) in einen zuvor linearsierten Vektor unter ATP-Verbrauch, katalysiert durch das Enzym DNA-Ligase, eingefügt.

Die Ligation ist eine kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten, dabei werden Phosphodiesterbindungen zwischen den freien 5'-Phosphatgruppen und den gegenüberliegenden 3'-Hydroxylgruppen von glatten oder überhängenden Enden doppelsträngiger DNA gebildet. Meistens wird die vom Bakteriophagen T4 codierte DNA-Ligase verwendet.

Sowohl der Vektor als auch die Fragmente mußten gefällt werden, da sonst das Volumen zur Ligation zu groß gewesen wäre. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt zu einem Volumen von 300 µl, das Volumen der geschnittenen Vektor-DNA betrug 50 µl, so dass ein Gesamtvolumen von 350 µl gefällt wurde. Zu diesem Ansatz wurden 35 µl Na-acetat (=1/10 Volumen) sowie 875 µl Ethanol (70 %) (= 2,5 faches Volumen) hinzugefügt. Der Ansatz wurde 15 min auf Eis inkubiert, danach in einer Sigmazentrifuge (Rotor 12154, Sigma, Osterode/Harz) 15 min bei 15 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet.

Das Pellet wurde in 18 µl A. bidest. aufgenommen (= 2,5 µg DNA) und zum Lösen ca. 10 min in einem 42 °C Wasserbad inkubiert. Dazu wurden 2 µl Ligasepuffer, sowie 2 µl T4 DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt/ Main) hinzupipettiert. Der Ligationsansatz wurde bei 12 °C über Nacht inkubiert.

Als Negativkontrolle diente 50 µl gefällter Supercos-Vektor, Behandlung siehe oben

Es wurde ein 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung der Ligation mit folgenden Proben gefahren: vor der Ligation, nach der Ligation, zusätzliche Kontrollen.

3.9.9 Infektion von *E. coli* VCS 321 mit Lambda-Phage und Vektor

Zur Infektion des *E. coli*-Stammes VCS 321 mit dem Phagenlysat und den darin enthaltenen Cosmiden werden Lysat und Bakterienkultur gemischt und bei 37 °C inkubiert. Dabei kommt es zur Adhäsion der Phagen an die Rezeptoren der Bakterienzellen und anschließend zur Injektion der DNA in die Zellen. Nach einer weiteren Inkubationsphase in neuem Medium werden die auf dem Cosmid gelegenen Resistenzgene exprimiert. Die Selektion der cosmidtragenden Klone erfolgt über AB-haltige Selektivmedien, die die entsprechenden Antibiotika (Ampicillin, Neomycin) enthalten.

Die Anzucht von *E. coli* VCS 321 (Stratagene, La Jolla, USA) erfolgte auf LB-Agarplatten über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (Heraeus, Göttingen). Es wurden 5 ml LB-Medium mit 0,2 % Maltose und 10 mM MgSO₄ (Endkonzentration) versetzt und mit 1 Kolonie *E. coli* VCS 321 angeimpft. Man läßt die Kultur bis zu OD₅₈₀ 0,88 wachsen und pelletiert die Zellen bei 4 °C, 500 x g, 10 min. Das Zellpellet wurde in 2,5 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert. Mit dem gleichen Puffer wurde die Kultur auf eine optische Dichte von OD 0,5 eingestellt.

Der Verpackungsextrakt beinhaltet alle Kopf- und Schwanzproteine, die zur korrekten Verpackung von DNA mit cos-sites notwendig ist, damit infektiöse, komplette Phagenpartikel entstehen. Es wurde 1 µg DNA zur Verpackung eingesetzt, gearbeitet wurde nach den Vorschriften des Herstellers (Gold packaging kit, Stratagene, La Jolla, USA). Die Cosmid Packaging Reaction (Stratagene, La Jolla, USA) wurde sowohl unverdünnt als auch 1:10 verdünnt zur Infektion verwendet. Je 25 µl Verdünnung und 25 µl Zellsuspension wurden zusammen in ein Reaktionsgefäß pipettiert und bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Anschließend wurden 200 µl LB-Medium hinzugegeben und bei 37 °C 1 Stunde inkubiert, damit die Antibiotikaresistenz exprimiert werden konnte.

Nach der Inkubation wurde 1 min bei 13.200 rpm (Eppendorf, Tischzentrifuge 5415D) zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet mit 50 µl LB-Medium resuspendiert. Diese Suspension wurde auf LB-Nähragarplatten, die 100 µg/ml Ampicillin enthielten, ausplattiert. Die Bebrütung erfolgt bei 37 °C, 24 h. Die gewachsenen Kolonien wurden gepickt und zur Überprüfung der Resistenzeigenschaften nochmals auf LB-Agarplatten mit Ampicillinzusatz angezüchtet.

3.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurden Trenngele der Größe 88 mm x 83 mm mit einer Schichtdicke von 0,75 mm und einem Polyacrylamidgehalt von 12 % gegossen. Hierzu wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Lösungen der Reihe nach zusammenpipettiert. Nach Zugabe von APS und TEMED wurde das Gemisch sofort in die Gelgießkammer (Hoefer SE 200, Pharmacia, Freiburg) eingefüllt und jeweils 120 µl n-Butanol aufgetropft. Nach der vollständigen Polymerisation der Trenngele (30 min bei 37°C) sowie Entfernen des n-Butanols wurde das Sammelgel gegossen und ein Kamm mit 10 Probestaschen eingeführt.

Tabelle 3 Pipettierschema zur Gelherstellung von SDS-Gelen

Lösung	Trenngel (12 %)	Sammelgel (5 %)
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1 (w/w) Stammlösung)	11,25 ml	3,125 ml
H ₂ O bidest	16,1 ml	18,125 ml
Trenngelpuffer	9,4 ml	-
Sammelgelpuffer	-	3,125 ml
10 % (w/v) SDS	0,375 ml	0,25 ml
10 % Ammoniumpersulfat (APS)	0,15 ml	0,15 ml
TEMED	0,05 ml	0,05 ml

Die Proben wurden mit 72 %iger Trichloressigsäure gefällt und anschließend in 10 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Um die Proteine zu denaturieren, wurden die Proben 3 min gekocht.

Die Proben wurden mit einer Hamilton-Spritze in die Probestaschen aufgetragen. Die Elektrophoresedauer betrug 2,5 h bei einer Spannung von 80 V in einer Hoefer „Mighty Small SE 200“ Kammer (Pharmacia, Freiburg). Während des Laufes wurde die Kammer

konstant auf 10 °C über ein Kryogerät (Pharmacia, Freiburg) gekühlt. Bei Erreichen des unteren Gelrandes durch die Bromphenolblaubande des Markers wurde der Lauf beendet.

Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl	pH 8,8
Sammelgelpuffer:	1 M Tris/HCl	pH 6,8
Laufpuffer:	25 mM Tris	
	250 mM Glycin	
	0,1 % (w/v) SDS	pH 8,3
SDS-Probenpuffer:	Roti ^R -Load, 4x konzentriert (Roth)	

SDS ist ein anionisches Detergenz, es überdeckt die Eigenladung der Proteine und bildet Micellen mit negativer Ladung. Das Erhitzen auf über 95 °C bewirkt die Auflösung der Tertiär- und Sekundärstruktur und damit die Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen sowie eine Streckung der Moleküle. Durch Zugabe von β -Mercaptoethanol werden die Disulfid-Brücken gespalten und man erhält insgesamt entfaltete, mit SDS beladene Aminosäureketten. Die Anlagerung von SDS erfolgt quantitativ im Verhältnis SDS : Protein = 1,4 : 1 und die Trennung in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) erfolgt nun anhand der Molekulargewichte der Proteine, da alle Proteine dieselbe negative Ladungsdichte besitzen.

Es besteht eine proportionale Beziehung zwischen der relativen Laufstrecke der Proteine und dem Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der einzelnen Proteinbanden wurde ein Standardmarker (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range, Bio-Rad Laboratories, München, siehe Tab. 4) aufgetragen.

Tabelle 4 Molekulargewichte der Standardproteine

Standard	Größe
Myosin	200.000 D
β - Galactosidase	116.250 D
Phosphorylase b	97.400 D
Serumalbumin	66.200 D
Ovalbumin	45.000D
Carboanhydrase	31.000 D
Trypsininhibitor	21.500 D
Lysozym	14.400 D
Aprotinin	6.500 D

3.11 Färbemethoden

3.11.1 Coomassieblau-Färbung

Die Nachweisgrenze für Proteine durch Coomassieblau liegt bei 0,1 - 2 µg Protein pro Bande.

Das Gel wurde aus der Gelapparatur genommen und in eine Schale mit Coomassie-Färbelösung gelegt. Der Färbevorgang dauerte bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln ca. 30 min, abhängig davon, wie gut sich die Proteine anfärben ließen. Zum Entfärben wurde das Gel in eine Entfärbelösung eingelegt und unter Schütteln bei Raumtemperatur entfärbt. Es wurde solange entfärbt, bis der Gelhintergrund nur noch leicht bläulich erschien und die Proteinbanden gut zu erkennen waren.

Coomassieblau

0,1 % Coomassie G 250, 40 % Ethanol, 10 % Eisessig wurden mit H₂O bidest auf 1000 ml aufgefüllt. Die Färbelösung wurde durch einen Faltenfilter filtriert.

Entfärbelösung

30 % Ethanol, 10 % Eisessig, 60 % H₂O

3.11.2 Silbernitratfärbung

Die Nachweisgrenze für Proteine durch Silbernitrat liegt bei ca. 0,05 µg Protein pro Bande, sie ist 10 - 50 mal empfindlicher als die Nachweismethode mit Coomassieblau.

Anleitung siehe Information Silver Stain Plus der Firma Biorad, Hercules, USA. Es wurde nach den Empfehlungen des Herstellers gearbeitet.

3.12 Western Blot für die N-terminale Sequenzierung der Hauptproteinbanden

Für den Western Blot wurde die Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Biorad, Hercules, USA) verwendet.

Zunächst wurde von den entsprechenden Proben eine SDS-PAGE angefertigt (siehe Kapitel 3.10) und beendet, kurz bevor die blaue Farbbande des Probenpuffers das Ende des Trenngeles erreicht hat.

Unmittelbar nach dem Lauf wurde das Gel geblottet. Hierzu wurden sowohl das Filterpapier (BioRad, München) als auch die verwendete PVDF-Membran (ImmobilonTM-P Transfer Membranes, Millipore, Schwalbach) in Towbinpuffer gewaschen, wobei die PVDF-Membran zuvor in Methanol geschwenkt wurde. Das Gel wurde 15 min ebenfalls in Towbinpuffer äquilibriert, um die Salze und Detergenzien des Elektrophoresepuffers zu entfernen.

Towbin-Puffer

25 mM Tris, 20 % Methanol, 192 mM Glycin, pH 8,3 wurden mit H₂O auf 1000 ml aufgefüllt.

Das Filterpapier wird luftblasenfrei auf die Anode aufgerollt, darauf wurde die PVDF-Membran luftblasenfrei aufgelegt, anschließend das SDS-Gel. Als oberste Schicht folgte nochmals Filterpapier, darauf wurde die Kathode aufgelegt. Die Transferzeit betrug 15 min mit einer Stromstärke von maximal 5,5 mA/cm². Anschließend wurde die Membran mit Coomassie Brilliant Blue R 250 (siehe Kapitel 3.11.1) gefärbt.

Hierzu wurde die Membran 5 min in der Färbelösung geschwenkt und anschließend 3x5 min in der Entfärbelösung (siehe Kapitel 3.11.1) entfärbt. Danach wurde die Membran bei Raumtemperatur getrocknet und die zuvor ausgewählten Banden ausgeschnitten. Die entsprechenden Banden wurden durch einen Edman-Abbau N-terminal ansequenziert (Firma Wittmann, Teltow).

Der Edman-Abbau ist ein zyklischer Prozeß, bei dem jeweils die letzte Aminosäure des Proteins abgespalten und identifiziert wird. Im ersten Schritt wird Phenylisothiocyanat (PTC) an die N-terminale Aminogruppe angebunden. Dieser Schritt erfolgt bei 40 – 55 °C und einem pH von 9, damit die Aminogruppe in unprotonierter Form vorliegt. Im nächsten Schritt, der Spaltung, wird das PTC-Peptid mit wasserfreier Säure behandelt. Die entstandene, instabile Form einer Aminosäure wird nun in eine stabile umgewandelt und das restliche Protein einem weiteren Abbauschritt unterworfen. Die so entstandenen Aminosäuren werden nun chromatographisch detektiert und anhand ihrer charakteristischen UV-Spektren zugeordnet.

3.13 Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden

Hybridisierungen dienen der Detektion von gleichen oder ähnlichen Nukleinsäuresequenzen, die auf eine Trägermembran transferiert wurden und mittels einer markierten DNA-Sonde nun detektiert werden können. Im Verlauf der Inkubation bindet die Sonde an die ihr homologen Bereiche und bildet so „Hybrid-Moleküle“, die nach Entfernen der nicht gebundenen Sonde durch eine Visualisierungsreaktion sichtbar gemacht werden.

3.13.1 Southern Blot

Die DNA-Fragmente wurden nach der Auftrennung im Agarosegel durch 0,4 M NaOH als Transfer-, Denaturierungs- und Fixierlösung auf eine Nylonmembran Hybond™ N+ (Amersham Pharmacia Biotech) übertragen. Die DNA-Fragmente werden denaturiert, mittels Kapillarströmen auf die Nylonmembran transferiert und dort gebunden. Der Southern Blot wurde entsprechend der vom Hersteller empfohlenen Protokolle durchgeführt. Die Transferzeit betrug mindestens 10 Stunden.

3.13.2 Synthese von Oligonukleotidsonden

Oligonukleotidsonden sind kurze, einzelsträngige Sonden auf Basis der Nukleinsäuresequenz, sie dienen dem Screening rekombinanter DNA-Bibliotheken, in diesem Falle dem Screening der erstellten Cosmidgenbank.

Die Sequenz der Oligonukleotide (siehe Tab. 5) wurde aus der N-terminalen Aminosäuresequenz dreier Proteine des Enterocolitins abgeleitet. Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes (d.h. dass mehrere Codons für eine Aminosäure kodieren) wurden Oligonukleotidsonden ausgewählt, die an den entsprechenden Wobble-Positionen Nukleotide mit Mehrfach-Funktionen enthielten.

Tabelle 5: Oligonukleotidsonden

Protein 1	Oligonukleotidsonde
Pro1 - PR 1	5`- TG ACY ATY CCN TTY ACY AAT ATY CC-3`
Pro1 - PR 2	5`- TG ACY ATY CCR TTY ACY AAC ATY CC-3`
Pro1 - PR 3	5`- TG ACY ATY CCR TTY ACY AAT ATT CC-3`
Pro1 - PR 4	5`- AAT ATT CCR TCW AAT YTR GGY ACY CC-3`
Pro1 - PR 5	5`- AAT ATT CCR AGY AAT YTR GGY ACY CC-3`
Protein 2	
Pro2 - PR 1	5`- TR AAY CCK ACY GCY ACY GCY CC-3`
Pro2 - PR 2	5`- TR AAT CCK ACY GCY ACY GCR CC-3`
Pro2 - PR 3	5`- TR AAT CCK ACY GCR ACY GCR CC-3`
Pro2 - PR 4	5`- TR AAT CCR ACY GCR ACY GCY CC-3`
Protein 3	
Pro3 - PR 1	5`- AAT ACY TCN AAT CGY CTG GCN GGY AC-3`
Pro3 - PR 2	5`- AAT ACY AGN AAT CGY CTG GCN GGY AC-3`

R =A oder G, K = G oderT, Y = C oder T, W = A oder T, N = A, C, g oder T

An die Oligonukleotide wurde am 5`-Ende jeweils ein Fluorescein-Rest gekoppelt, so dass eine Detektion mit dem Hybridisierungs-Kit „Renaissance® Kit“ (Du Pont, NEN® Research Products, Heidelberg) möglich war. Alle Oligonukleotide wurden von Pharmacia Biotech, Freiburg bezogen.

3.13.3 Hybridisierung

Alle Hybridisierungen und Visualisierungen wurden mit dem „Renaissance® Kit“ (Du Pont, NEN® Research Products, Heidelberg) durchgeführt. Das Prinzip dieses Kits beruht darauf, dass die Sonde mit Fluoreszein markiert ist, das mit Hilfe der indirekten Chemolumineszenz sichtbar gemacht wird.

An die eigentlichen Hybridisierungsschritte schließt sich die Inkubation mit dem Antikörperkonjugat an, die nachfolgende katalytische Reaktion mit dem Substrat Luminol (enthält Meerrettichperoxidase) bewirkt eine Lichtemission, die mit Röntgenfilmen detektiert werden kann und somit die Lage der DNA-Hybridmoleküle anzeigt.

Die Hybridisierungsschritte werden gemäß den Vorschriften des Herstellers durchgeführt, lediglich die Hybridisierungstemperaturen und die Hybridisierungspuffer wurden modifiziert, da für kurze Oligonukleotide weniger stringente Bedingungen eingesetzt werden müssen. Unter stringenten Waschbedingungen werden alle DNA-Hybride mit zu geringer Homologie (= hoher Anteil an Basenfehlpaarungen) wieder in Einzelstränge überführt und nur die genau passenden Doppelstränge bleiben an der Membran haften. Mit steigender Salzkonzentration des Waschpuffers sinkt die Stringenz, ebenso mit sinkender Hybridisierungstemperatur.

Hybridisierungspuffer:

5x SSC, 0,1% SDS, 0,5% Blockingreagenz, 5% Dextransulfat wurden mit H₂O auf 1000 ml aufgefüllt.

3.14 Isolierung virulenter Phagen

Die virulenten Phagen wurden aus Schweinegülle isoliert. Hierzu wurde die Gülle mit 0,9 % physiologischer NaCl verdünnt, abzentrifugiert (Sigma Zentrifuge, Sigma, Osterode/Harz) und über einen 0,45 µm Filter (Schleicher und Schuell, Dassel) sterilfiltriert.

Die so gewonnenen Lysate wurden im Spotttest sowohl unverdünnt als auch 1:10 verdünnt auf verschiedenen *Yersinia*-Stämmen, sowie bei zwei unterschiedlichen Temperaturen getestet.

Bei Auftreten unterschiedlicher Plaquemorphologien wurde der jeweilige Plaquebereich mit der Impföse aus dem Softagar ausgestochen, in 800 µl SM-Puffer (siehe Kapitel 3.15) mit einem Glasstab homogenisiert und 30 Sekunden gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37 °C wurde das Lysat über einen Spritzenfilter (FP 30/0,2, Schleicher und Schuell, Dassel) sterilfiltriert. Dieses Lysat wurde nochmals in Softagar nach der Softagar-Overlaymethode (siehe Kapitel 3.7.2) eingegossen und die Plaquemorphologie nach 24 h Inkubation bei 37 °C neu beurteilt.

3.15 Bestimmung des Phagentiters

Der Phagentiter wurde anhand des Softagar-Overlaytests erfaßt (ADAMS, 1959). Hierzu wurden Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase verwendet (OD₅₈₈ 0,6- 0,8). Die

zu testenden Lysate wurden in einer dekadischen Verdünnungsreihe mit SM-Puffer verdünnt.

SM-Puffer:

50 mM Tris/HCl pH 7,5; 5,8 g NaCl; 2 g MgSO₄ x 7 H₂O wurden auf 1000 ml A. bidest aufgefüllt.

Von der Bakteriensuspension wurden 100 µl mit 100 µl der entsprechenden Lysatverdünnung vermischt, nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur zur Adsorption der Phagen an die Bakterien wurden 4 ml Softagar (ca. 50 °C warm) dazugegeben. Das Gemisch wurde anschließend zügig auf eine LB-Agarplatte unter Vermeidung von Luftblasen verteilt. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank bebrütet. Zur Titerbestimmung wurden die gut auszählbaren Platten bewertet. Die Anzahl der Plaques im Bakterienrasen entspricht unter Einberechnung der Verdünnungsstufe der Anzahl der infektiösen Phagen im Lysat und damit dem Phagentiter (pfu/ml = plaque forming units/ml).

3.16 Vermehrung und Reinigung virulenter Phagen

Die Lysate wurden von Agarplatten mit konfluenter Lysis der Bakterien im Softagar gewonnen.

Der Stamm *Y. enterocolitica* 13169 (OD₅₈₈ 0,6-0,8) wurde mit geeigneten Konzentrationen von Phagenlysaten infiziert. Nach 24 h zeigten die Softagarplatten eine konfluente Lyse, d.h. die Ränder der Plaques verschmolzen gerade miteinander und konnten abgeerntet werden. Der Softagar wurde unter Zuhilfenahme eines sterilen Spatels abgeschabt und in einem sterilen Becherglas gesammelt. Auf den abgelösten Softagar von 20 Agarplatten wurde ein Volumen von ca. 100 ml SM-Puffer gegeben, die Suspension wurde 2 Stunden unter Rühren bei Raumtemperatur inkubiert.

Bakterien und Agartrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt (10 min, 8000 rpm, 4 °C, Sigma 3K30, Rotor 19776), der Überstand wurde sterilfiltriert (Membranfilter, 0,45 µm Porengröße, Schleicher und Schuell, Dassel). Zelluläre Nukleinsäuremoleküle werden durch Zugabe von 1 µg/ml DNaseI und 2 µg/ml RNase A verdaut. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei 37 °C.

Die Aufkonzentrierung durch Ultrazentrifugation stellt eine Standardmethode dar, mittels der man hochtitrige Lysate für die CsCl-Dichtegradientenzentrifugation erhält. Die zuvor gewonnenen Lysate wurden in Polyallomerzentrifugenröhrchen abgefüllt (Volumen: 90 ml, Quick-Seal, Beckman), anschließend wurden die Röhrchen zugeschweißt und die Phagen durch Ultrazentrifugation pelletiert. (45.000 rpm, 10 °C, 2 h, Beckman L8 70 Ultrazentrifuge, Rotor 45 Ti). Der Überstand wurde komplett dekantiert, das Pellet wurde in 5 ml SM-Puffer resuspendiert.

Zur Reinigung wurden die Lysate analog zur Bacteriocinreinigung (siehe Kapitel 3.6.1) auf einen vorgeschichteten CsCl-Gradienten in Polyallomerzentrifugenröhrchen (Volumen: 34 ml, Beckman) aufgetragen (28.000 rpm = 141.370 x g, Beckman Rotor SW 28) 16 h, 10 °C. Nach dem Zentrifugationslauf wurde die milchig-weiße Bande von außen mittels einer Kanüle mit aufgesetzter Spritze abgesaugt (Abb. 1). Um nach der Zentrifugation die Dichteschicht abschätzen zu können, in der die Bande gelaufen war, wurden die einzelnen Schichten beim Schichten des Gradienten von außen am Röhrchen markiert.

Um das CsCl aus den so gewonnenen Lysaten wieder zu entfernen, wurden die Phagenkonzentrate gegen SM-Puffer dialysiert. Das Material wurde in Dialyseschläuche gefüllt (Durchmesser 21 mm, Porengröße 25 A, MWCO 12000 bis 14000 D, Serva, Heidelberg). Die Dialyse erfolgte bei 4 °C, wobei das Volumen von ca. 2 l SM-Puffer zweimal ausgetauscht wurde. Danach wurde die hochtitrige Phagenlösung entsprechend verdünnt und im Therapieversuch eingesetzt.

3.17 Präparation von Phagen-DNA

Jeweils 500 µl Phagensuspension wurden in Eppendorfreaktionsgefäßen mit dem gleichen Volumen Phenol, pH 8 versetzt und 30 Sekunden gevortext, 60 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend nochmals 30 Sekunden gevortext. Durch die Phenolbehandlung wird die Phagen-DNA aus den Kapsiden freigesetzt. Um eine Phasentrennung zu erreichen wurde 2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (13.200 rpm, Tischzentrifuge, Eppendorf). Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zur Reinigung und Abtrennung noch vorhandener Proteine wurde nun das gleiche Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v) hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Die obere Phase wurde wieder abgenommen und mit 1/10 Volumen 3 M Na-acetat versetzt sowie 2 Volumen Ethanol, 70 %. So kommt es zur Ausfällung von Nukleinsäuren in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen und

Alkoholkonzentrationen >60 %. Die DNA wurde bei –20 °C für mindestens 2 h gefällt. Danach wurde die DNA durch Zentrifugation pelletiert (30 min, 13200 rpm, Tischzentrifuge, Eppendorf). Die Salzreste aus dem Pellet wurden durch Waschen mit Ethanol 70 % entfernt, anschließend wurde unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in 20 µl TE-Puffer resuspendiert.

3.18 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der kontinuierlichen Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe.

Das Prinzip der Elektrophorese beruht auf der Wanderung von in Flüssigkeit dispergierter oder kolloidal gelöster geladener Teilchen. Dabei bewegen sich die Partikel mit positiver Ladung zur Kathode, die negativ geladenen zur Anode. Maßgebend für die Trennschärfe der Elektrophorese ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen. Diese wiederum ist abhängig von der Form und Größe der Teilchen, ihrer Ladung, ihres pH-Wertes, der Temperatur sowie der Viskosität des Agarosegels und der Feldstärke. Kleinere DNA-Fragmente legen deshalb im elektrischen Feld eine größere Strecke zurück, als größere Fragmente. Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte in Horizontalelektrophorese-Apparaturen (Life Technologies, Karlsruhe und Biometra, Göttingen). Je nach Anforderung wurden 0,6 - 1,0 % Agarose-Gele eingesetzt. Zur Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde zu 100 ml Agarose-Lösung 5 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/ml) zugegeben. Als Laufpuffer diente 1 x TBE-Puffer. Die Proben wurden mit 6 x Loading Dye Solution versetzt. Die Laufzeit und die angelegte Spannung variierten mit der Größe und Konzentration der Gele zwischen 1 - 3 Stunden und 70 - 110 Volt.

Unter UV-Licht konnten die Gele ausgewertet und fotografiert werden (System INTAS 95KFE103, Drucker Mitsubishi P90E)

1x TBE-Puffer

100 mM Tris-HCl; 100 mM Borsäure; 1 mM EDTA, pH 8.0 wurden in A. bidest gelöst.

6 x Loading Dye Solution

0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol; 30 % Glycerol

3.19 Zellkulturversuche

3.19.1 Invasions- und Adhäsionsversuche

Es wurden HEp-2 Zellen aus der Zellkulturstammsammlung der FU Berlin verwendet. Die HEp-2 Zellen werden in RPMI 1640 Medium (GIBCO BRL, Karlsruhe), supplementiert mit 5 % Kälberserum (GIBCO BRL) und 2 mM Glutamin bei 37°C in Anwesenheit von 5 % CO₂ kultiviert und regelmäßig passagiert.

Am Vortag des Versuches wurden 10⁵ HEp-2 Zellen pro ml in jedes Well der 24 Loch-Schale (Nunc, Wiesbaden) gegeben. Die Zelldichte sollte subkonfluent sein.

Y. enterocolitica 13169 wurde am Versuchstag aus einer Übernachtskultur in frisches LB-Medium überimpft, 2 h bei 28 °C im Schüttelwasserbad bei 180 rpm kultiviert. Durch Zentrifugation wurden die Bakterien geerntet (14.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge), 3 min). Die geernteten Bakterien wurden in 1 ml PBS, pH 7,4 aufgenommen. Die gewünschte Keimdichte beträgt 10⁷ Bakterien pro ml. Vor der Infektion wurden die Zellen einmal mit PBS pH 7,4 gewaschen, der Überstand wurde abgesaugt und 0,5 ml frisches RPMI-Medium mit 5 x 10⁵ Bakterien pro Well wurden zugefügt. Die Bakterien adhärten an die eukaryonten Zellen bzw. wanderten in die Zellen ein. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei Raumtemperatur beim Adhäsionsversuch, und 1 h bei 37 °C beim Invasionsversuch. Danach wurde das Medium mit den darin enthaltenen Bakterien abgesaugt und die Zellen wurden erneut einmal mit PBS pH 7,4 gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von Enterocolitacin in den entsprechenden Verdünnungen (1,3 x 10⁵ AU/ml und 1,3 x 10⁴ AU/ml) mit dem RPMI-Medium im Gesamtvolumen von 0,5 ml. Der Inkubationszeitraum war 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3,0 h; die Inkubationstemperatur betrug für den Adhäsionsassay 28 °C, für den Invasionsassay 37 °C.

Nach Ende der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen, um nicht gebundene Bakterien zu entfernen, anschließend wurden 200 µl Triton X-100 0,1 % zur Lyse der Zellen zugegeben. Zur Quantifizierung der überlebenden Yersinien wurde jeweils ein Aliquot einer Verdünnungsreihe auf LB-Medium ausplattiert. Die Berechnung der koloniebildenden Einheiten ergab sich aus dem Verhältnis der eingesetzten Bakterien zu den überlebenden Bakterien.

Für den Invasionsassay wurde ein Zwischenschritt eingeschoben: nach 1 h Inkubation mit *Y. enterocolitica* 13169 bei 37 °C wurde einmal mit PBS gewaschen, anschließend wurden die

Bakterien im Überstand durch Zugabe von Gentamicin abgetötet in einer Konzentration von 50 µg/ml (gelöst in RPMI-Medium, Inkubationszeit 1 h), danach wurde viermal gewaschen, um das Gentamicin zu entfernen. Die Zugabe von Bacteriocin erfolgte analog zum Adhäsionsassay, ebenso die Inkubationszeiten. Waschen, Lyse mit Triton X-100 0,1% und das Waschen der Zellen mit PBS erfolgt analog zum Adhäsionsversuch ebenso das Ausplattieren.

PBS

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ wurden in 800 ml H₂O bidest. gelöst, mit HCl w=37% auf pH 7,4 eingestellt, mit A. bidest auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert.

3.20 Tierversuch

3.20.1 Tiere und Haltungsbedingungen

Für den Versuch wurden insgesamt 278 weibliche Balb/C-Mäuse (Lieferant: BgVV, Berlin) im Alter von 6 - 8 Wochen verwendet. Die Tiere wurden in Gruppen zu fünf in Makrolonkäfigen Typ II bei einer Raumtemperatur von 20-24 °C und einer Luftfeuchte von 30 – 70 % gehalten. Es herrschte ein 12 h Licht/ 12 h Dunkel Rhythmus. Futter und Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung.

3.20.2 Infektion der Tiere

3.20.2.1 Herstellung des Inokulums

In einem 300 ml Erlenmeyerkolben wurden 100 ml LB-Flüssigmedium mit 3 - 5 Kolonien *Y. enterocolitica* 13169 beimpft und bei 28°C über Nacht auf einem Rundschüttler (200 rpm) inkubiert. Die dicht bewachsene Kultur wurde in Falconröhrchen (je 50 ml) überführt, 5 Minuten bei 4000 rpm und 4 °C sedimentiert (Sigma-Zentrifuge, Rotor 19776), anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet zweimal mit PBS gewaschen und mit jeweils 25 ml PBS aufgenommen, um eine Keimzahl von ca. 10⁹ Bakterien/ml zu erreichen. Die Keimzahlbestimmung erfolgte durch Herstellen einer dekadischen Verdünnungsreihe, die auf *Yersinia*-Selektivagar ausplattiert wurde. Die Inkubation erfolgt 48 h bei 28 °C,

danach erfolgte die Auszählung der Kolonien. Alle Keimzahlbestimmungen wurden im Doppelansatz durchgeführt.

3.20.2.2 Infektion der Mäuse

Die Mäuse der entsprechenden Gruppen erhielten jeweils 0,5 ml der hergestellten Suspension oral mittels einer Knopfkanüle verabreicht. Die Futtergabe war weiterhin ad libitum, die Wasserversorgung war ebenfalls nicht reglementiert.

Die einzelnen Versuchsgruppen bestanden aus einer Kontrollgruppe und den entsprechenden Therapiegruppen. Die Kontrollgruppe erhielt nur die Bakteriensuspension, im Falle der Phagentherapieversuche erhielt eine zusätzliche Kontrollgruppe nur den Phagen, die Therapiegruppen erhielten entweder eine einmalige Enterocolitacin- bzw. eine einmalige Phagengabe, oder eine zweite Enterocoliticingabe im Abstand von 24 Stunden. Die Enterocoliticingabe erfolgte immer oral mittels Knopfkanüle, die Phagengabe entweder oral oder intraperitoneal. Die Probennahme erfolgte in vorher festgelegten Zeitabständen, wobei pro Zeitpunkt jeweils aus der entsprechenden Versuchsgruppe 5 Tieren getötet wurden. Die Tiere wurden mit CO₂ in einem Exsikkator getötet und gleich im Anschluß daran sezziert. Es wurden die Organe Leber, Milz, Niere, Tonsillenäquivalent, Ileum, Cäcum und der Kot isoliert und sofort in sterilen Petrischalen auf Eis gelagert. Die entnommenen Organe wurden 1:10 mit PBS versetzt, mit einigen Scherenschlägen zerteilt und im Homogenisator (Seward, Westbury, USA) homogenisiert (2 min, höchste Geschwindigkeit). Die Homogenisate wurden in Eppendorfreaktionsgefäße umgefüllt und von allen Organen wurden mit PBS dekadische Verdünnungsreihen angesetzt, die auf *Yersinia*-Selektivmedium ausplattiert wurden. Die Keimzahlbestimmungen erfolgten jeweils als Doppelbestimmung, es wird die Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro ml (CFU/ml) festgestellt.

3.21 Überprüfung des Serovars

Um zu überprüfen, ob es sich tatsächlich um das Serovar O:3 bei den wiedergefundenen Yersinien handelt, wurde mit O:3 Antiserum agglutiniert. Hierzu wurde mit der Impföse eine ausgewählte Kolonie abgenommen und mit dem Antiserum (SIFIN, Berlin), das gegen die O-Antigene des O:3 Serovars gerichtet ist, agglutiniert. Im positiven Falle kommt es zur Agglutination, die durch einen Niederschlag im Tropfen sichtbar wird. Die Trübung kommt durch Bildung von Antigen-Antikörperkomplexen zustande. Es wurde nach der

Objektträgeragglutinations-Methode von ALEKSIC u. BOCKEMÜHL (1984) gearbeitet. Es wurde ein Querschnitt einer willkürlichen Auswahl von Kolonien getestet.

3.22 Bestimmung des Enterocoliticens- bzw. des Phagentiters

Die Homogenisate der Therapiegruppe und der Phagenkontrollgruppe wurden zusätzlich auf den jeweiligen Phagen- bzw. Bacteriocintiter getestet. Dazu wurden Aliquots der Homogenisate (100 µl) mit einem Tropfen Chloroform versetzt, nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurden jeweils 20 µl entnommen und im Softagar-Overlaytest getestet (siehe Kapitel 3.7.2) und somit auf die PFU/ml bzw. AU/ml zurückgeschlossen.

3.23 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Präparate wurden mittels Negativkontrastierung dargestellt. Hierzu wurden die mit Kohle bedampften Kupfernetze für 3 min in 0,005 %iger Bacitracinlösung zur Herabsetzung der hydropoben Eigenschaften der Kupfernetze inkubiert. Anschließend wurden 10 µl Enterocoliticinlösung bzw. Phagenlysate auf die vorbehandelten Netze aufgetropft. Die Inkubationszeit betrug 5 min, die verbleibende Flüssigkeit wurde abgesaugt. Die Netze wurden mit A. bidest. gewaschen und mit 1 %iger Phosphatwolframsäure kontrastiert, die Aufbewahrung bis zur elektronenmikroskopischen Untersuchung (Elektronenmikroskop: Phillips, Niederlande; Modell 400) erfolgte auf Papierfiltern bei Raumtemperatur.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des Enterocoliticin

Ausgangsstamm für die Enterocoliticinproduktion war der Stamm *Y. enterocolitica* 29930, der im Rahmen einer Diplomarbeit bereits näher charakterisiert wurde (GEWINNER, 1998).

4.1.1 Produktion von Enterocoliticin

Nach Optimierung von Produktions- und Reinigungsverfahren ergab sich folgende Prozedur für die Enterocoliticinproduktion:

Aus einer Übernachtskultur von *Y. enterocolitica* 29930 wurden 10 ml in 790 ml M9-Medium angeimpft. Nach Induktion mit Mitomycin C und einer Kultivierungszeit von 14 Stunden bei einer Temperatur von 20 °C wurde der Kulturüberstand durch Zentrifugation abgeerntet und durch zwei Filtrationsschritte von Bakterienresten befreit.

Zur näheren Charakterisierung der Eigenschaften des Enterocoliticans wurde zunächst ein Reinigungsverfahren für die aus dem Kulturüberstand gewonnene Substanz entwickelt.

4.1.2 Chromatographieverfahren

Das Enterocoliticin wurde verschiedenen Chromatographieverfahren unterworfen. Die Ionenaustauschchromatographie wird häufig als erster Schritt einer Proteinreinigung angewendet, um zunächst die prominentesten Proteinfractionen aufgrund ihrer Nettoladungen zu trennen. Dabei binden im Falle eines Anionenaustauschers negativ geladene (= anionische) Proteine an positiv geladene Diethylaminoethylcellulose (DEAE-Sephrose, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Das gebundene Protein kann eluiert werden, indem man die Salzkonzentration des Elutionspuffers erhöht. Die positiven Ionen des Puffers konkurrieren mit den positiv geladenen Gruppen des Proteins um die Bindungsstellen der Säule. Proteine mit einer geringen positiven Ladungsdichte verlassen die Säule zuerst, dann folgen diejenigen mit höherer Ladungsdichte.

Das Enterocoliticin konnte an keines der ausgewählten Ionenaustauscherharze (z.B. Resource M, Amersham-Pharmacia, Freiburg) genügend gebunden werden, an einen Kationenaustauscher erfolgte gar keine Bindung, wohingegen das Enterocoliticin an einen

schwachen Anionenaustauscher (DEAE-Sepharose, Amersham Pharmacia, Freiburg) binden konnte, dann aber nicht in einem scharfen Peak durch Erhöhung der Salzkonzentration wieder abgelöst werden konnte. Die eingesetzte Aktivität konnte nur mit großen Verlusten wiedergefunden werden, auch in der SDS-PAGE waren entweder keine oder nur sehr schwache Proteinbanden zu finden.

Als alternative Trennungsmethode wurde die Gelfiltration getestet, deren Trennungsprinzip darin besteht, dass die Moleküle aufgrund ihres Größenunterschiedes durch das Molekularsieb getrennt werden, wobei auch empfindliche Proteine ohne Beschädigung voneinander separiert werden können. Nachteil der Gelfiltration ist die hohe Verdünnung, der das Protein unterliegt, so dass auch hier nur wenig Aktivität wiedergefunden werden konnte. Ebenso war in den SDS-Gelen nur wenig Protein wiederzufinden.

Auch andere chromatographische Methoden brachten keine sinnvollen Resultate, es wurde immer zu wenig Aktivität wiedergefunden, so dass eine andere Reinigungsstrategie eingeschlagen werden musste. Da in der Literatur beschrieben ist, dass einige Bacteriocine eine partikuläre Struktur aufweisen (z.B. defekte Phagenpartikel), wurde die folgende Reinigungsstrategie eingeschlagen:

4.1.3 Ultrazentrifugationsverfahren

Die Reinigung von Enterocolicin erfolgte zunächst auf rein physikalischem Wege. Es wurden sowohl Zentrifugationsschritte in der normalen Zentrifuge, als auch eine Reihe von Zentrifugationsschritten in der Ultrazentrifuge verwendet. Als letzter Zentrifugationsschritt erfolgte ein CsCl-Gradient. Um die aktiven Banden zu identifizieren, wurde zunächst der Gradient ausgetropft und die einzelnen Fraktionen auf Aktivität überprüft, später wurde nur die opak-weißliche Bande mit einer Spritze abgesaugt, da die Bande dem Peak der Hauptaktivität entsprach (Abb. 3).

Gradiententitration

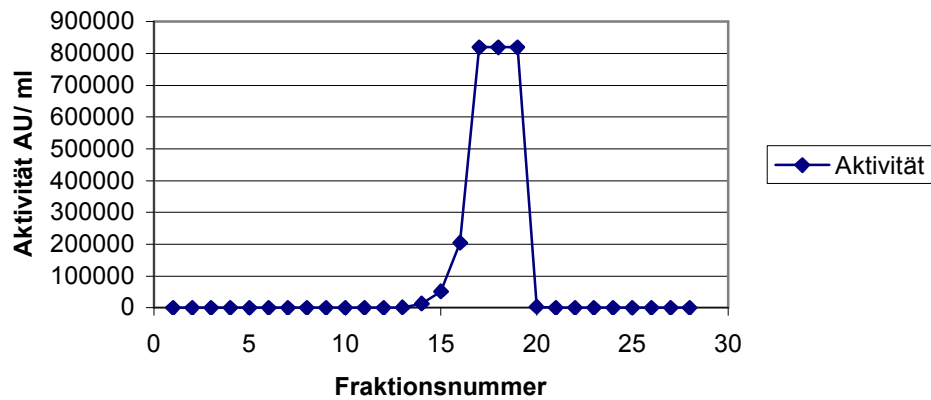
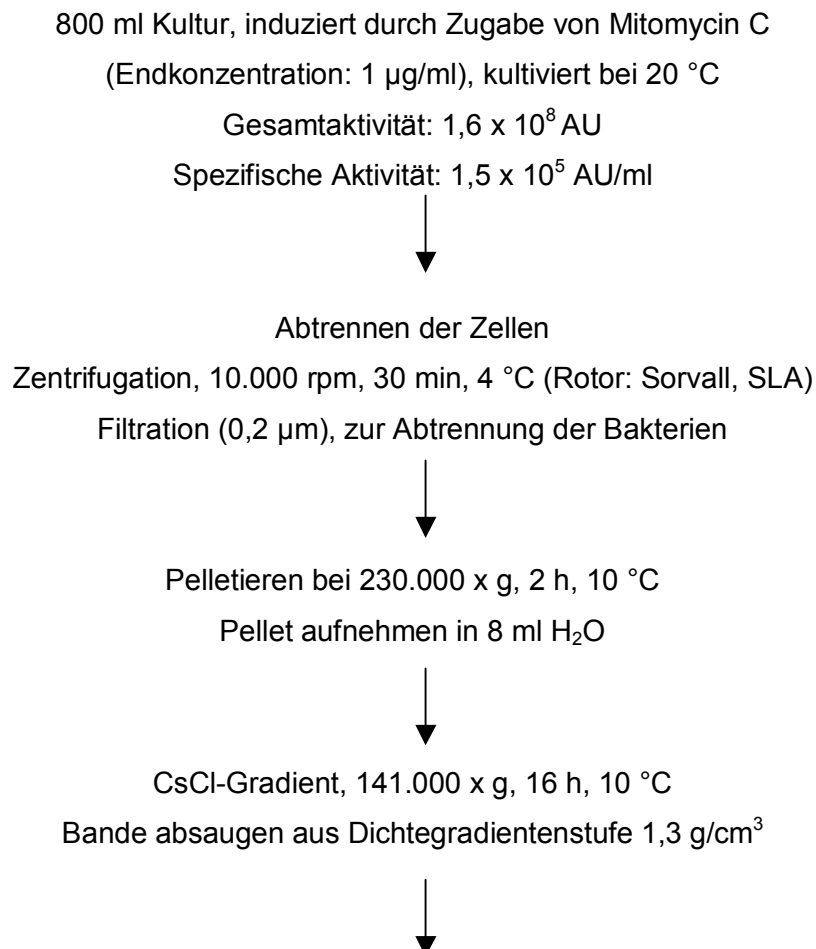


Abbildung 3 Überprüfung der einzelnen Fraktionen auf Aktivität
Volumen der Fraktionen ca. 750 µl. Die Fraktionen 16 - 20 entsprachen der opaken Bande.

4.1.4 Reinigungsschema für Enterocoliticin aus *Y. enterocolitica* 29930

Die Reinigungsstrategie für das Enterocoliticin folgte diesem Reinigungsschema:



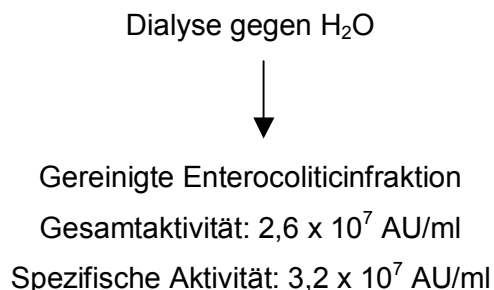


Abbildung 4 Reinigungsschema für Enterocoliticin

Um eine Reinigungstabelle zu erstellen und somit die Reinigung zu dokumentieren, wurde nach jedem Reinigungsschritt ein Aliquot abgenommen und die Aktivität mittels Softagar-Overlaytest nach FALKINER u. KEANE (1977) bestimmt. Versuche, den Proteingehalt der gewonnenen, gereinigten Fraktionen mittels Proteinbestimmung nach Peterson zu bestimmen, erwiesen sich als nicht reproduzierbar und stellten somit kein praktikables Instrument zur Quantifizierung der enthaltenen Proteinmenge dar, da das Biuret-Reagenz offenbar unspezifisch an die Enterocoliticin-Partikel band. Die spezifische Aktivität der einzelnen Reinigungsschritte wurde anhand der jeweiligen Aktivität der dazugehörigen Aliquots ermittelt. Tabelle 6 zeigt einen typischen Reinigungsverlauf mit den jeweiligen Ausbeuten der entsprechenden Reinigungsstufen.

Tabelle 6 Reinigungstabelle

Aufarbeitungsschritt	Volumen ml	Aktivität/ 20 µl	Spez. Aktivität AU/ ml	Gesamtaktivit.	% Ausbeute
Kulturüberstand	800	4.096	2×10^5	$1,6 \times 10^8$	100 %
Ultrazentrifugation	75	16.384	$8,2 \times 10^5$	$6,1 \times 10^7$	39 %
CsCl-Bande	2	262.144	$3,2 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$	17 %

4.1.5 Gelfiltration

Nach Abschluß der Ultrazentrifugation lief das dialysierte Material aus dem CsCl-Gradienten über eine Gelfiltrationssäule Sephacryl S 400-HR (Amersham Pharmacia, Freiburg), um die Reinheit des gewonnenen Materials zu überprüfen. Das Enterocoliticin wurde mit dem Ausschlußvolumen von der Säule gewaschen, dies zeigt, dass die gewonnene Substanz ein sehr hohes Molekulargewicht hat. Verunreinigende Proteine waren in der Präparation fast nicht enthalten. Aus diesem Grund wurde bei weiteren Präparationen auf diesen Schritt verzichtet. Da der Hauptpeak, der mit den Fraktionen 9 bis 12 eluiert wurde, auch dem Hauptpeak der Aktivität entsprach, handelte es sich hierbei um das Enterocoliticin (Abb. 5).

In der SDS-PAGE zeigte sich die Hauptmenge an Protein in den Fraktionen 9 und 10, in den Fraktionen 11- 15 lag die Proteinkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze durch die Coomassie-Färbung (Abb. 6). Aktivität konnte dennoch in den entsprechenden Fraktionen nachgewiesen werden.

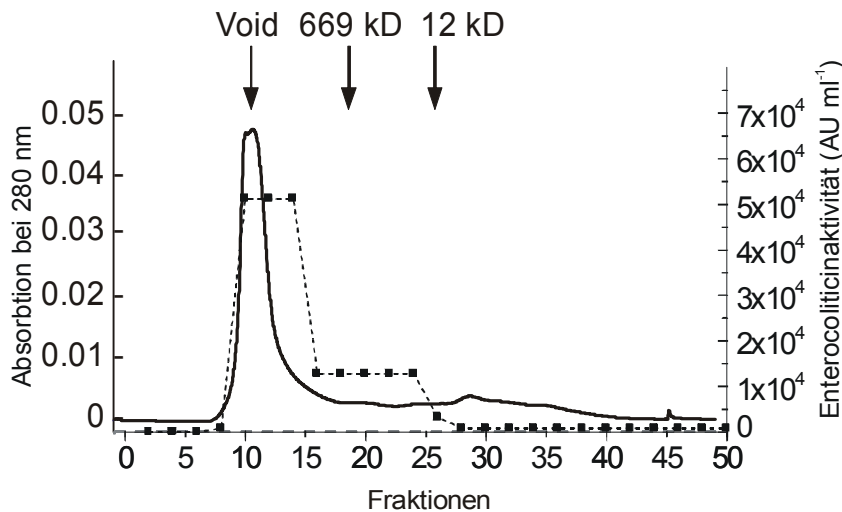


Abbildung 5 Gelfiltration (GF) über Sephacryl S 400-HR-Säule, Elutionspuffer ALEX-Puffer pH 8,0, Durchflußrate 1 ml/min, Fraktionsgröße: 2 ml Void= Ausschlussvolumen, --- Enterocolitacinaktivität,

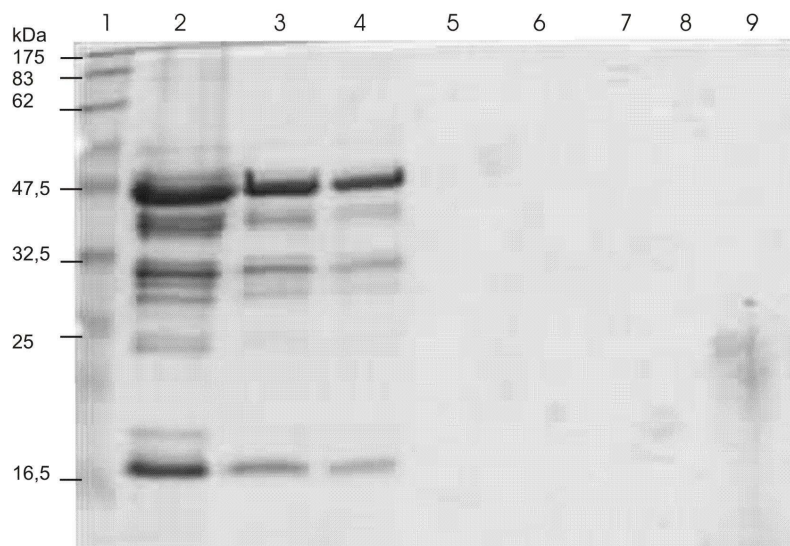


Abbildung 6 SDS-PAGE aus Gelfiltrationsfraktionen, Färbung: Coomassie
1 Marker, **2** Überstand aus Enterocolitacinproduktion, **3** GF Fraktion 9, **4** GF Fraktion 10, **5** GF Fraktion 11, **6** GF Fraktion 12, **7** GF Fraktion 13, **8** GF Fraktion 14, **9** GF Fraktion 15

4.1.6 Charakterisierung der Eigenschaften des Enterocoliticens

4.1.6.1 Produktionskurve Enterocoliticin

Es wurde aus einer Übernachtskultur eine Wachstumskurve von *Y. enterocolitica* 29930 in LB-Medium erfaßt und die mit dem Zellgift Mitomycin C induzierte Enterocoliticinexpression ermittelt. Stündlich wurden sowohl Messungen der optischen Dichte bei 588 nm durchgeführt als auch Proben genommen, die mittels Softagar-Overlaytest auf intrazelluläre und extrazelluläre Enterocoliticinaktivität überprüft wurden, um so die gefundene Enterocoliticinaktivität zu quantifizieren.

Zur Überprüfung der extrazellulären Aktivität wurden Spots aus dem Überstand angefertigt, zur Überprüfung der intrazellulären Aktivität wurden die durch Zentrifugation gewonnenen Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen, mit Chloroform behandelt und anschließend im Softagar-Overlaytest nach FALKINER u. KEANE überprüft, die Aktivität betrug weniger als 5 % der Gesamtaktivität.

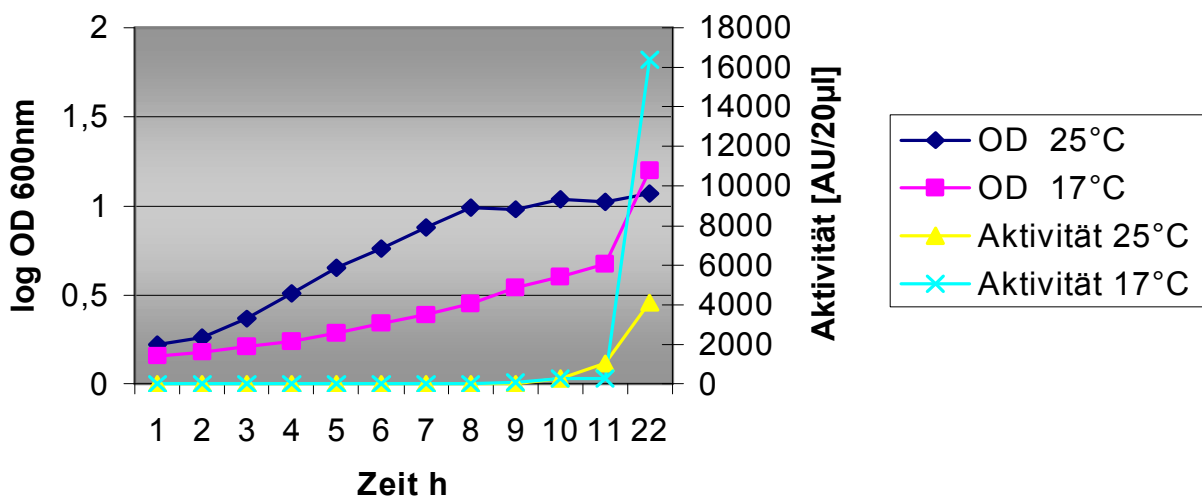


Abbildung 7 Wachstumskurve des Stammes *Y. enterocolitica* 29930 bei 25 °C und 17 °C, sowie die extrazelluläre Aktivität des Enterocoliticens im Kulturüberstand

Ein Anstieg der extrazellulären Aktivität erfolgte sowohl bei 17 °C als auch bei 25 °C (Abb. 7), wobei bei 25 °C ein schnellerer Anstieg der Enterocoliticinbildung bereits nach 11 h erreicht wurde. Der bei 17 °C erreichte Anstieg der Aktivität war nach 22 h jedoch wesentlich höher, wie aus Abb. 7 ersichtlich wird.

4.1.6.2 Stabilität bei Proteinase K

Proteinase K ist eine unspezifische Serin-Proteinase , in Gegenwart von 0,1 % SDS wird die Aktivität des Enzyms wesentlich verstärkt. Es inaktiviert sehr schnell native Proteine (Proteinase K, Boehringer, Mannheim).

Das Enterocoliticin ist nicht Proteinase K-stabil, es wird selbst bei Zusatz hoher Verdünnungsstufen von Proteinase K zerstört. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen Proteinase K (12,8 mg/ml, 6,4 mg/ml, 3,2 mg/ml, 1,6 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,2 mg/ml Endkonzentration) zugesetzt und nach 1 h Inkubationszeit wurde die Aktivität des Enterocoliticans mit dem Softagar-Overlaytest überprüft. Hierbei konnte in keiner der verwendeten Enzymverdünnungsstufen noch Aktivität detektiert werden. Es handelt sich bei dem Enterocoliticin also offensichtlich um einen proteinhaltigen Partikel, dessen Aktivität bei Anwesenheit von Proteinase K zerstört wird.

4.1.6.3 Elektronenmikroskopie

Das Enterocoliticin besteht, analog zu Phagenschwänzen, aus einem hohlen Injektionsrohr (Abb. 8), das von einer äußeren Hülle ganz umschlossen wird. Diese Hülle wird aus rechtshelikal angeordneten Untereinheiten aufgebaut. Am oberen Ende ist die Hülle leicht zugespitzt, das andere Ende mündet in einer etwas breiteren Basalplatte, an der Adsorptionsfasern inserieren. Das Enterocoliticin hat eine Länge von 80 x 15 nm, dies entspricht der Länge der Schwanzhülle (Sheath) im relaxierten Zustand, im kontrahierten Zustand betragen die Maße 35 x 20 nm. Der Schwanzstift (Core) hat eine Länge von 80 nm und einen Durchmesser von 5 nm.

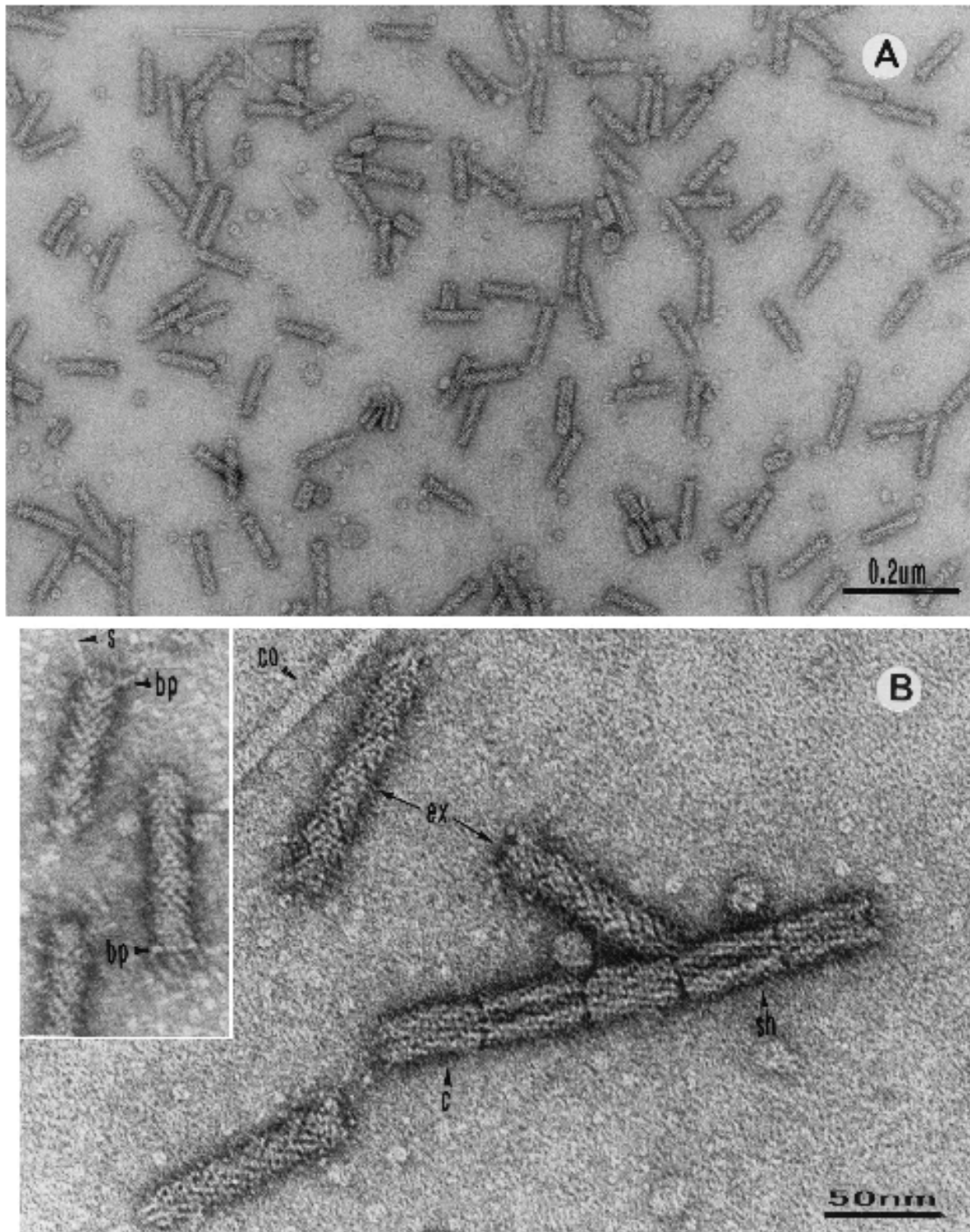


Abbildung 8 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Enterocolitins

Negativfärbung. (A) Kontrahierte und nicht-kontrahierte phagenschwanzähnliche Strukturen. (B) Detaildarstellung der Enterocolitcinpartikel

ex: nicht kontrahierte Partikel, c: kontrahierte Partikel, sh: sheath; co: core; s: Spikes; bp: Basisplatte
Die EM-Aufnahmen wurden von Herrn Dr. Wecke, Robert Koch-Institut angefertigt

4.1.6.4 Wirkungsspektrum des Enterocoliticins

Die Überprüfung des Wirkungsspektrums des Enterocoliticins erfolgte mittels Softagar-Overlaytest, wobei die zu überprüfenden Stämme (Tab. 7) in den Softagar eingegossen wurden und die entsprechenden Enterocoliticinkonzentrationen aufgespottet wurden.

Da Bacteriocine definitionsgemäß ein sehr enges Wirkungsspektrum haben und nur sehr eng verwandte Stämme oder Species abtöten, zeigte das Enterocolitacin erwartungsgemäß keinen Einfluß auf die getesteten Stämme.

Tabelle 7 getestete Bakterienstämme auf Enterocolitacinempfindlichkeit

Stamm	Aktivität
<i>St. aureus</i> Sg 511	–
<i>St. aureus</i> ATCC 25923	–
<i>St. aureus</i> Amme	–
<i>St. aureus</i> ATCC 6538	–
<i>S. Typhimurium</i> Typ 1	–
<i>S. Typhimurium</i> Typ 3	–
<i>S. Typhimurium</i> LT 2	–
<i>Citrobacter freundii</i> CB1614	–
<i>Ps. fluorescens</i> ATCC 13525	–
<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 27853	–
<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 15492	–
<i>Ps. putida</i>	–
<i>Enterobacter cloacae</i> CB1643	–
<i>E. faecium</i>	–
<i>B. subtilis</i>	–
<i>B. subtilis</i> var. Niger ATCC 9372	–
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	–
<i>Vibrio harveyi</i> DSM 2332	–
<i>Vibrio harveyi</i> DSM 6904	–
<i>E. coli</i> , verschiedene Serovare	–

Um den genaueren Wirkungsbereich innerhalb der Gattung *Yersinia* abzugrenzen, wurden verschiedene *Y. enterocolitica*-Serovare und verschiedene *Yersinia*-Species getestet (Tab. 8).

Tabelle 8 Wirkungsbereich von Enterocoliticin

Stamm	Serovar/ Biovar	Aktivität
<i>Y. enterocolitica</i>		
111 RKI	O:3	+
134 RKI	O:3	+
W 120	O:3	+
ZW 83	O:3	+
ZW 84	O:3	+
13169	O:3	+
13169/2	O:3	+
22066	O:3	+
22067	O:3	+
22509	O:3	+
29820	O:3	+
IP 161	O:8	-
Carter 08	O:8	-
H 739/86	O:8	-
H 705/86	O:9	+
H 4991/93	O:9	+
IP 885	O:9	+
25078	O:9	+
31077	O:9	+
31080	O:9	+
83/88	O:5,27	+
31105	O:5,27	+
966/89	O:5,27	+
29299	O:5,27	+
29980	O:10	+
<i>Y. intermedia</i>		
208/ 87		-
209/ 87		-
210/ 87		-
29932		-
604/ 87		+
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		
25204		-
25743		-
27705		-
27707		-
28288		-

Fortsetzung Tab. 8 Wirkungsbereich von Enterocolitacin

Stamm	Serovar/ Biovar	Aktivität
<i>Y. kristensenii</i>		
24780		+
577/ 87		+
7230		-
7229		-
585/ 87		-
<i>Y. frederiksenii</i>		
K 606		+
8286		+
7211		+
8910		+
K 743		-
588/ 87		-

Es waren insbesondere die pathogenen *Y. enterocolitica*-Stämme O:5,27; O:9 und O:3 sensitiv.

4.1.7 Sequenzieren der Hauptproteinbanden

Um Oligonukleotidsonden für die Detektion der Gene des Enterocolitacins auf dem Chromosom von *Y. enterocolitica* 29930 abzuleiten, wurden drei ausgewählte Enterocolitacinproteine ansequenziert. Die Sequenzierungsarbeiten wurden von der Firma WITA GmbH, Teltow durchgeführt.

Zur Sequenzierung durch den Edman-Abbau wurden die drei prominentesten Proteinbanden ausgewählt, da auch nach sämtlichen durchgeführten Reinigungsschritten immer noch 8 - 10 deutliche Banden zu sehen waren. Die ausgewählten Proteinbanden lagen im Größenbereich 55 kD, 30 kD und 16 kD (Abb. 9).

Zu diesem Zweck wurden CsCl-gereinigte, entsalzte Enterocolitacin-Präparationen mittels SDS-PAGE (Gel 12%) aufgetrennt. Die Proteine wurden nach den Vorschriften der Firma mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Coomassieblau angefärbt (Abb. 9). Anschließend erfolgte die Ansequenzierung der Proteine durch den Edman-Abbau. Aus der so ermittelten Aminosäuresequenz wurden die entsprechenden Aminosäuren in den Nukleinsäurekode übersetzt. Daraus wurden Oligonukleotidsonden synthetisiert, um mittels DNA-DNA-Hybridisierungen den entsprechenden Genabschnitt auf dem Genom von *Y. enterocolitica* 29930, der für das Enterocolitacin kodiert, zu finden.

Frühere Untersuchungen in der Arbeitsgruppe hatten es wahrscheinlich gemacht, dass der entsprechende Locus nicht auf dem kryptischen Plasmid zu finden ist, was zum Beispiel bei den Colicinen aus *E. coli* üblicherweise der Fall ist.

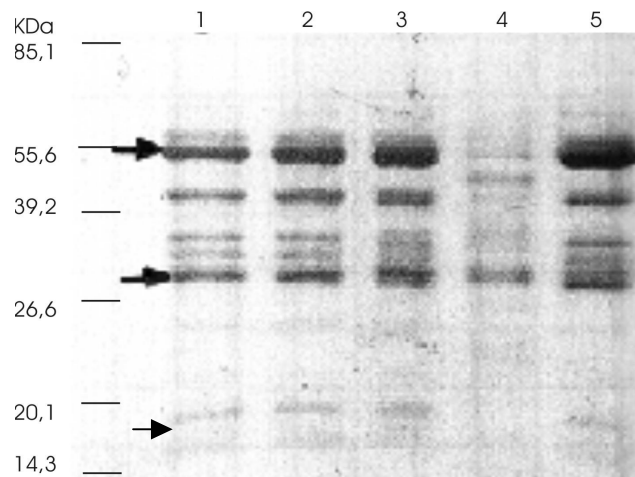


Abbildung 9 Western Blot mit gekennzeichneten Proteinbanden
Färbung Coomassieblau, gezeigt werden verschiedene CsCl-Präparationen
Spur 1-3, 5 CsCl-Bande, **Spur 4** ALEX-Fraktion als Vergleich

Ergebnis der N-terminalen Sequenzierung:

Bei jedem der einzelnen Zyklen des Edman-Abbaus wurde eine Aminosäure abgespalten und aufgrund ihres spezifischen Spektrums detektiert (Tab. 9).

Tabelle 9 Durch Edman-Abbau analysierte Aminosäuren

Zyklusnummer	Aminosäure	Zyklusnummer	Aminosäure
Protein 1 55 kDa		Protein 2 30 kDa	
1	Threonin	1	Alanin
2	Isoleucin	2	Asparagin
3	Prolin	3	Leucin
4	Phenylalanin	4	Serin
5	Threonin	5	Leucin
6	Asparagin	6	Asparagin
7	Isoleucin	7	Prolin
8	Prolin	8	Threonin
9	Serin	9	Alanin
10	Asparagin	10	Threonin
11	Leucin	11	Alanin
12	Glycin	12	Prolin
13	Threonin	13	Serin
14	Prolin	14	Leucin
15	Leucin/ Threonin	15	Threonin
16	Serin	16	Phenylalanin
17	Phenylalanin	17	Phenylalanin

Zyklusnummer	Aminosäure
Protein 3 16 kDa	
1	Serin
2	Asparagin
3	Threonin
4	Serin
5	Asparagin
6	Arginin
7	Leucin
8	Alanin
9	Glycin
10	Threonin

Diese Aminosäuresequenzen wurden durch eine Codon-Usage-Tabelle (Tab. 10) in eine Nukleinsäureabfolge umgewandelt. Die meisten Aminosäuren werden durch mehr als nur ein Basentriplett (= Codon) kodiert und es gibt für die einzelnen Spezies unterschiedliche Häufigkeiten, welche Codons verwendet werden. Diese Wahrscheinlichkeiten, in denen ein bestimmtes Basentriplett für eine bestimmte Aminosäure kodiert, sind in Codon-Usage-Tabellen zusammengetragen und man kann diesen Datenbanken die wahrscheinlichste Basenzusammensetzung für eine bestimmte Aminosäure entnehmen. Für gleiche Aminosäuren kodierende Codons sind synonyme Codons, die in der Regel in den ersten

beiden Positionen übereinstimmen und in der dritten Position eine degenerierte Base enthalten. Diese Position wird auch Wobble-Base genannt.

Tabelle 10: Codon-Usage-Tabelle für *Y. enterocolitica*

299 CDS's (87438 codons)

fields: [triplet] [frequency: per thousand] ([number])

[Quelle: www.kazusa.or.jp/, Stand: Oktober 1999]

UUU 21.8(1902) UCU 12.6(1106) UAU 19.6(1711) UGU 5.4(471)
 UUC 13.3(1163) UCC 7.6(667) UAC 8.3(724) UGC 5.1(442)
 UUA 23.3(2033) UCA 14.0(1227) UAA 1.7(148) UGA 1.3(117)
 UUG 19.7(1722) UCG 7.6(664) UAG 0.4(34) UGG 12.8(1116)

CUU 14.2(1243) CCU 11.2(982) CAU 14.5(1267) CGU 16.9(1476)
 CUC 9.9(865) CCC 7.2(632) CAC 7.4(649) CGC 17.0(1486)
 CUA 7.4(643) CCA 11.0(965) CAA 24.2(2115) CGA 5.2(457)
 CUG 35.6(3114) CCG 13.9(1215) CAG 25.2(2201) CGG 7.1(620)

AUU 30.4(2655) ACU 13.6(1188) AAU 26.0(2273) AGU 14.7(1289)
 AUC 19.3(1686) ACC 19.9(1741) AAC 16.4(1435) AGC 15.6(1368)
 AUA 12.1(1058) ACA 11.0(965) AAA 33.1(2892) AGA 5.2(454)
 AUG 25.8(2252) ACG 11.0(960) AAG 12.6(1101) AGG 3.0(264)

GUU 21.3(1862) GCU 20.3(1777) GAU 33.5(2925) GGU 22.5(1963)
 GUC 14.0(1221) GCC 23.2(2029) GAC 16.1(1409) GGC 22.1(1932)
 GUA 12.3(1074) GCA 19.8(1730) GAA 36.2(3166) GGA 9.0(791)
 GUG 20.6(1800) GCG 22.1(1932) GAG 20.5(1794) GGG 14.6(1275)

Coding GC 47.81% 1st letter GC 55.59% 2nd letter GC 40.37% 3rd letter GC 47.48%

Aus der Codon-Usage-Tabelle wurde für jede der Proteinsequenzen eine Nukleotidabfolge zusammengestellt, auf deren Basis Oligonukleotidsonden (siehe 3.13) synthetisiert wurden, die an den „Wobble“-Positionen teilweise degeneriert waren. Für Protein 1 wurden 5 mögliche Oligonukleotidsonden erstellt, für Protein 2 vier mögliche und für Protein 3 zwei mögliche Sonden. Es wurden aufgrund des degenerierten Kodes jeweils mehrere mögliche Nukleotidabfolgen gewählt, um möglichst wenig variable Nukleotide in der Sonde zu haben. Eine Datenbanksuche zu den gefundenen N-terminalen Proteinsequenzabfolgen brachte

keine Suchergebnisse, es wurden aufgrund der kurzen Aminosäuresequenzen keine Ähnlichkeiten gefunden (vgl. Diskussion).

4.1.8 Hybridisierungsversuche

Es wurden Oligonukleotidsonden von unterschiedlicher Länge synthetisiert (Tab. 11).

Tabelle 11 Länge der synthetisierten Oligonukleotide

Protein1- Oligonukleotid	Länge
Pro1-Pr 1	25mer
Pro1-Pr 2	25mer
Pro1-Pr 3	25mer
Pro1-Pr 4	26mer
Pro1-Pr 5	26mer
Protein 2- Oligonukleotid	
Pro2-Pr 1	22mer
Pro2-Pr 2	22mer
Pro2-Pr 3	22mer
Pro2-Pr 4	22mer
Protein 3- Oligonukleotid	
Pro3-Pr 1	26mer
Pro3-Pr 2	26mer

Es gibt mehrere Parameter, die die Reassoziationskinetik der DNA von Einzelsträngen zu Doppelsträngen beeinflussen. Experimentell werden die Parameter Inkubationstemperatur und Kationen-Konzentration verändert. Die Inkubationstemperatur sollte 20-25 °C unter dem Schmelzpunkt T_m des Doppelstranges liegen, die Kationenkonzentration verringert die intermolekulare Abstoßung zwischen den negativ geladenen Einzelsträngen. Zur Variation der Kationenkonzentration wurde der Salzgehalt des Hybridisierungspuffers verändert. Zur Bestimmung der ungefähren Hybridisierungstemperatur wurde die folgende Formel herangezogen:

$$T_m = 81,5 \text{ °C} + 16,61 \times (\log[\text{Na}^+]) + (\text{G/C-Anzahl}) - (600/\text{N})$$

T_m = Schmelztemperatur

$[\text{Na}^+]$: Konzentration der Na-Ionen des Hybridisierungspuffers = 0,825 mol/l

G/C-Gehalt des entsprechenden Oligonucleotids

N: Länge des Oligonucleotids

Es ergaben sich für die Hybridisierungen mit den Oligonukleotiden optimale Temperaturen zwischen 28 und 40 °C, die jeweils verwendeten Temperaturen können Tab. 11 entnommen werden. Die Bedingungen für die DNA-DNA Hybridisierungen müssen sehr viel weniger stringent gewählt werden (siehe Tab. 12) als bei üblichen Hybridisierungsreaktionen, dadurch muß sowohl die Hybridisierungstemperatur als auch der Salzgehalt der Hybridisierungspuffer für die jeweilige Oligonukleotidsonde optimiert werden.

Die Hybridisierungen fanden mit Gesamt-DNA aus *Y. enterocolitica* 29930 statt, die DNA wurde über Southern Blot bzw. über Slot-Blot-Vakuumtechnik an eine Nylonmembran fixiert. Die Endkonzentration der Sonde bei allen Hybridisierungen betrug 10 pmol/ml.

Tabelle 12 Ergebnis der Optimierung der Hybridisierungen

Oligonukleotid	Temperatur	Salzgehalt des Hybridisierungs-puffers	Ergebnis
Mix aus:			
Pro 3 Pr1 Pro1 Pr1 Pro1 Pr4 Pro2 Pr1	35 °C	RNA-Methode	Keine Signale
Pro 3 Pr1 Pro1 Pr1 Pro1 Pr4 Pro2 Pr1	22 °C 28 °C	5x SSC	Sehr viele Signale
Pro1 Pr1 Pro1 Pr4	35 °C	6x SSC 3x SSC	Wenig Signale
Pro1 Pr1 Pro1 Pr3 Pro1 Pr4 Pro1 Pr5	35 °C	6x SSC	Signale bei Pro1 Pr5
Pro1 Pr5	35 °C	6x SSC	Keine Signale
Pro 3 Pr1 Pro1 Pr1 Pro1 Pr4 Pro2 Pr1	40 °C	RNA-Methode	Signale bei Pro 3 Pr1 Pro2 Pr1

Fortsetzung: Tabelle 12 Ergebnis der Optimierung der Hybridisierungen

Oligonukleotid	Temperatur	Salzgehalt des Hybridisierungs-puffers	Ergebnis
Mix aus:			
Pro 3 Pr1 Pro1 Pr1 Pro1 Pr4 Pro2 Pr1	40 °C	RNA-Methode	Signale bei Pro 3 Pr1 Pro2 Pr1
Pro1 Pr1 Pro1 Pr2 Pro1 Pr3 Pro1 Pr4 Pro1 Pr5	35 °C	RNA-Methode	Keine Signale
Pro1 Pr1 Pro1 Pr3 Pro1 Pr4 Pro1 Pr5	40 °C	RNA-Methode	Keine Signale
Pro1 Pr1 Pro1 Pr3 Pro1 Pr4 Pro1 Pr5 Pro2 Pr1 Pro 3 Pr1	40 °C	3x SSC	Signale bei Pro 3 Pr1 Pro2 Pr1
Pro 3 Pr1 Pro1 Pr1 Pro1 Pr4 Pro2 Pr1	35 °C	3x SSC	Signale bei Pro2 Pr1
Pro2 Pr1 Pro 3 Pr1	35 °C	3x SSC	Sehr viele Signale
Pro 3 Pr1 Pro1 Pr1 Pro1 Pr4 Pro2 Pr1	35 °C	3x SSC	Pro1 Pr1 schwache Signale Pro2 Pr1 viele Signale Pro 3 Pr1 viele Signale
Pro1 Pr5 Pro2 Pr2 Pro2 Pr4 Pro3 Pr2	35 °C	3x SSC	Keine Signale

Die Ergebnisse der Hybridisierungen erwiesen sich als sehr schwierig in der Interpretation und als sehr schwierig in der Reproduzierbarkeit der positiven Hybridisierungssignale. Deshalb wurden die Hybridisierungsversuche zunächst eingestellt und eine andere Strategie entwickelt.

Es wurden aus dem im Labor vorhandenen *Yersinia*-Phagenbestand verschiedene Phagen aus Umweltisolaten auf ihre Tauglichkeit als Sonde überprüft, wobei hier stringendere Bedingungen als bei den Hybridisierungsversuchen mit den Oligonukleotidsonden angewendet werden konnten. Grundlage dazu stellte dar, dass der phagenschwanzähnliche Partikel morphologisch und biochemisch Verwandtschaft zu intakten Phagen hat und somit ein intakter *Yersinia*-Phage als Sonde dienen kann. Aus den verschiedenen,

charakterisierten Phagen wurden mittels Zufallsprimern Sonden kreiert, mit denen die geblotteten Verdau von *Y. enterocolitica* hybridisiert werden konnten (Tab. 13).

Tabelle 13 Ergebnis der Hybridisierungen

Phage	Hybridisierungsergebnis
PY 20	keine Signale
PY 31	keine Signale
PY 54	keine Signale
PY 61	Signale
PY 95	keine Signale
PY 96	deutliche Signale

Es wurden hier stringendere Methoden als bei der Hybridisierung mit Oligonukleotiden angewendet, unspezifische Bindungen konnten besser ausgeschaltet werden. Es wurde bei 65 °C hybridisiert und die Salzkonzentrationen der Pufferlösungen entsprachen den normalen Standardbedingungen. Als Sonde wurde PY 96 favorisiert, da dieser Phage die deutlichsten Hybridisierungssignale zeigte (Abb. 10).

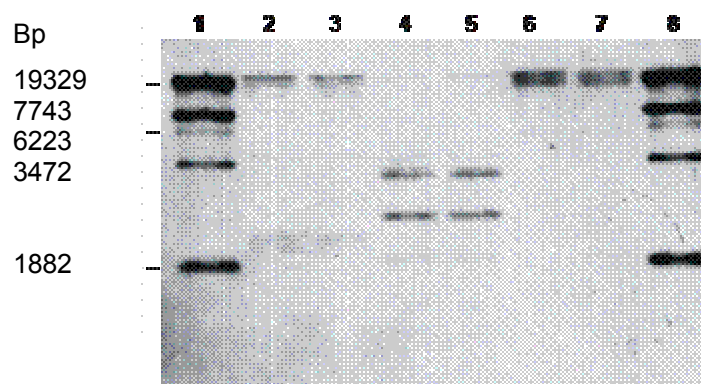


Abbildung 10 Southern Blot mit Sonde PY96,

es wurden jeweils 1 µg/ml und 0,5 µg/ml DNA pro Spur aufgetragen

1 Marker, **2** *Y. enterocolitica* 29930 *Bam*HI-Verdau, **3** *Y. enterocolitica* 29930 *Bam*HI-Verdau, **4** *Y. enterocolitica* 29930 *Hind*III-Verdau, **5** *Y. enterocolitica* 29930 *Hind*III-Verdau, **6** *Y. enterocolitica* 29930 *Pst*I-Verdau, **7** *Y. enterocolitica* 29930 *Pst*I-Verdau, **8** Marker

4.1.9 Screening der Cosmidgenbank

Mit Hilfe einer genomischen Bibliothek sollte nun die für die Enterocoliticinbildung verantwortliche DNA-Region des *Y. enterocolitica*-Stammes 29930 mittels PY 96-Sonde identifiziert werden.

Hierzu wurde die Gesamt-DNA des Stammes *Y. enterocolitica* 29930 mit der Restriktionsendonuclease *Sau3a* partiell verdaut und anschließend in einem kontinuierlichen Saccharosegradienten entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, um Fragmente von einer Größe von ca. 30 kb zu isolieren. Die entsprechenden Fragmente wurden gefällt, um ihre Konzentration zu erhöhen.

Die DNA-Fragmente wurden in den Vektor Supercos, der sowohl *Xba*I als auch *Bam*HI restringiert war, ligiert. Aufgrund der *cos*-sites des Vektors wurden die Ligationsansätze von den Phagenköpfen in der Verpackungsreaktion verpackt und anschließend wurde der *E. coli*-Stamm VCS 321 mit den Phagen infiziert und dann auf LB/Ampicillin-Agarplatten selektiert.

Die auf LB mit Ampicillin gewachsenen, gepickten Kolonien wurden in LB/Ampicillin-Flüssigmedium angezogen und die enthaltenen Plasmide mittels alkalischer Lyse gereinigt. Auf diese Weise wurde von 400 Klonen, die statistisch zur Abdeckung des Genoms von *Y. enterocolitica* 29930 notwendig waren, das entsprechende Plasmid isoliert. Die Anzahl der notwendigen Klone wurde mit nachfolgender Formel berechnet:

$$N = \ln(1-P) / \ln[1-(F/G)]$$

G Genomgröße in Basenpaaren

F durchschnittliche Größe der Insert- DNA

N Anzahl voneinander unabhängiger Klone, unter denen sich das gesuchte Gen befindet

P Wahrscheinlichkeit, mit der sich das gesuchte Gen in der Sammlung von Klonen befindet

Bei einer angenommenen Genomgröße von $4,5 \times 10^6$ bp und einer Insertgröße der DNA im Cosmidklon von 35 kbp mit einer 95 %igen Sicherheit, dass das Genom abgedeckt ist, ergab sich die Anzahl von 383 Klonen (WINNACKER, 1987).

Es wurden zunächst 40 Pools mit jeweils 10 Klonen gebildet und im Slot-Blot-Verfahren auf eine Nylonmembran gebunden und anschließend mit einer Sonde aus PY 96 hybridisiert. Hier wurden die Pools ausgewählt, die die stärksten Hybridisierungssignale zeigten und die

einzelnen Klone separat im Slot-Blot-Verfahren auf eine Nylonmembran geblottet und erneut mit der Sonde aus PY 96 hybridisiert. Es wurden auch hier die Klone mit den stärksten Signalen ausgewählt und mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *Eco32I* verdaut.

Dieser Restriktionsverdau wurde erneut auf eine Nylonmembran geblottet und mit der Phagensonde hybridisiert, wobei bei 4 Klonen deutliche Signale zu erkennen waren (Abb.11).

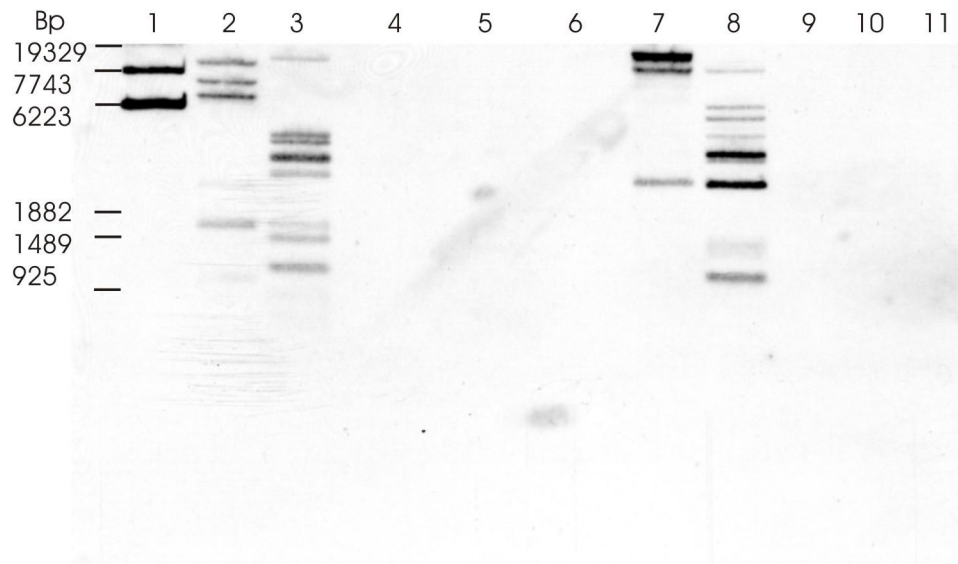


Abbildung 11 Southernblot der verdauten Cosmide,

Sonde: PY 96 Bahn 1 Marker, 2 C13 *EcoRI*, 3 C13 *Eco32I*, 4 C 88 *EcoRI*, 5 C 88 *Eco32I*, 6 leer, 7 C 85 *EcoRI*, 8 C 85 *Eco32I*, 9 leer, 10 C 88 *EcoRI*, 11 C 88 *Eco32I*

Es wurden die vier ausgewählten Klone mit *EcoRI* und *Eco23I* verdaut, die Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran geblottet. Klon 13 und Klon 85 erwiesen sich als die vielversprechendsten Klone, die Verwandtschaft mit dem Enterocoliticin zeigten. Um das Fragment genau lokalisieren zu können, wurden die ausgewählten Klone in der Arbeitsgruppe mittels Shotgun-Sequenzierung teilweise ansequenziert. Die Sequenzen zeigten jedoch keine Homologien zu entsprechenden Phagen-DNA Sequenzen aus Datenbanken.

4.2 Charakterisierung des Phagen PY 100

Ausgangsmaterial für die Isolation des Phagen war eine Probe aus Schweinegülle, die aus dem Güllebehälter eines Schweinemastbetriebes in Mecklenburg-Vorpommern im Jahr 2001 gezogen wurde. Es wurde im Schweinebestand gesucht, da man davon ausgehen kann, dass Schweinebestände häufig mit *Yersinien* durchseucht sind. Da nach einem *Yersinia*-Phagen gesucht wurde, der bei 37 °C virulent ist, um ihn für die Phagentherapie nutzen zu können, wurde das Wirtsspektrum insbesondere bei 37 °C getestet. Abb. 12 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme des Phagen.

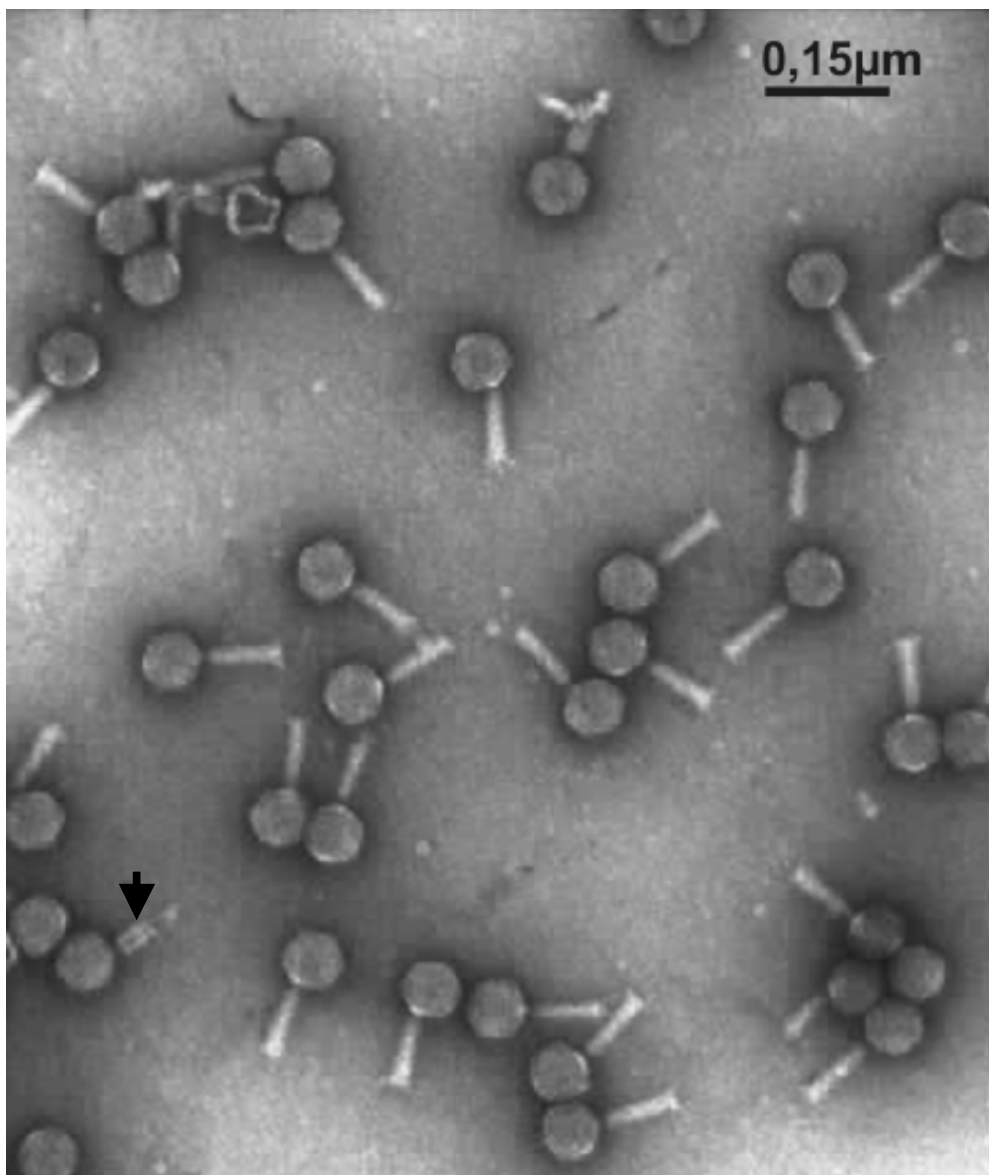


Abbildung 12 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Phagen PY 100, Negativfärbung, dargestellt sind Phagen mit nicht-kontrahierten und kontrahierten (Pfeil) Schwänzen. Die EM-Aufnahmen wurden von Herrn Dr. Özel und Frau Holland, Robert Koch-Institut, angefertigt.

4.2.1 Plaquemorphologie

Es traten unterschiedliche Plaquemorphologien auf, man konnte große (5 mm), kleine (<1 mm) und mittlere Plaques (ca. 2 mm) unterscheiden, so dass zunächst von verschiedenen Phagen ausgegangen werden mußte, da normalerweise eine bestimmte Plauegröße für einen Phagen charakteristisch ist. Um dies zu überprüfen, wurde eine Reinigung über Einzelplaques vorgenommen. Doch auch nach mehreren Schritten über Einzelplaques zeigten die Plaques noch immer die gleiche unterschiedliche Morphologie, so dass man an dieser Stelle doch von nur einem einzigen Phagen ausgehen kann.

Von den so gewonnenen Rein-Lysaten wurden die Phagen vermehrt, danach wurde aus den Phagenköpfen die DNA isoliert und einem Restriktionsverdau unterzogen, um so zunächst Restriktionsenzyme zu finden, die die Phagen-DNA in Fragmente zerlegen, um die Restriktionsmuster der einzelnen Fragmente vergleichen zu können. *HindIII* und *BamHI* schnitten die DNA kaum, so dass *EcoRI*, *HpaI* und *DraI* Verwendung fanden.

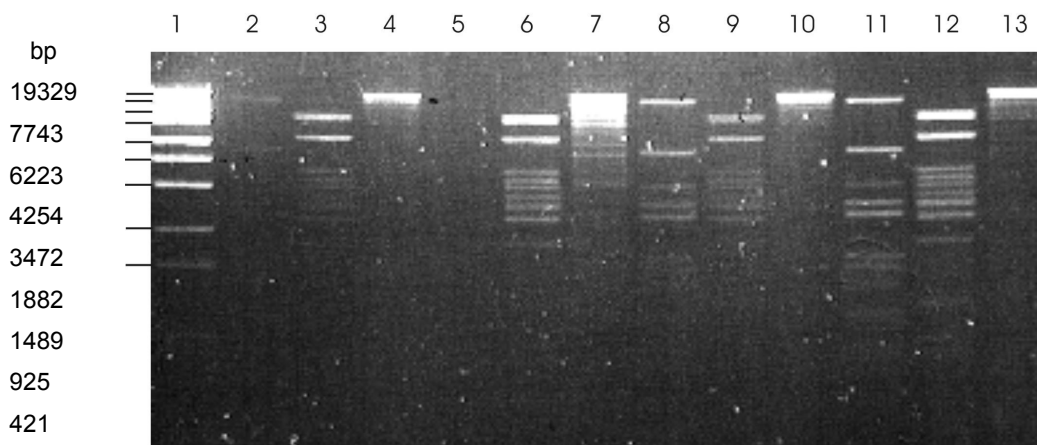


Abbildung 13 Agarose-Gelelektrophorese: Vergleich der *DraI*-, *HpaI*- und *EcoRI*-Verdaumuster von ausgewählten Einzelplaques

Bahn 1 Marker, 2 **Plaque 1** *DraI*-Verdau, 3 **Plaque 1** *HpaI*, 4 **Plaque 1** *EcoRI*, 5 **Plaque 2** *DraI*, 6 **Plaque 2** *HpaI*, 7 **Plaque 2** *EcoRI*, 8 **Plaque 3** *DraI*, 9 **Plaque 3** *HpaI*, 10 **Plaque 3** *EcoRI*, 11 **Plaque 4** *DraI*, 12 **Plaque 4** *HpaI*, 13 **Plaque 4** *EcoRI*

Die Restriktionsverdau sahen bei jedem der 3 Restriktionsenzyme sowie bei allen ausgewählten Einzelplaquelysaten die Fragmente identisch aus, so dass sich das bereits genannte Ergebnis hier bestätigt und es sich um einen einzigen Phagen handelt (Abb. 13).

4.2.2 Phagenvermehrung und –aufreinigung

Die Vermehrung des Phagen, ausgehend von einem Einzelplaque, erfolgte über Softagarplatten mit konfluenter Lyse des *Yersinia*-Stammes. Die Konzentrierung durch die Pelletierung in der Ultrazentrifuge erbrachte eine Anreicherung der Phagen, der nachfolgende Schritt der Reinigung und Konzentration durch den CsCl-Gradienten erbrachte nochmals eine Anreicherung.

4.2.3 Genomgröße des Phagen

Anhand von Restriktionsverdauemustern lässt sich die Größe eines Genoms ungefähr abschätzen, indem man die Größe der einzelnen, verschieden großen Fragmente aufsummiert. In Abb. 14 sind beispielhaft einige Verdauungen des Phagen PY 100 gezeigt. Für die vorläufige Größenbestimmung erwies sich der Restriktionsverdau mit dem Enzym *EcoRI* als geeignet. Durch eine lange Laufzeit des Agarose-Gels wurden die einzelnen Fragmente vollständig aufgetrennt. Nach Addition der Größe der einzelnen Fragmente ergab sich eine Größe des Phagengenoms von etwa 45 kbp, mittlerweile wurde das Phagengenom in der Arbeitsgruppe vollständig sequenziert (Firma GATC, Konstanz) und eine Größe von 50.293 Nukleotiden ermittelt.

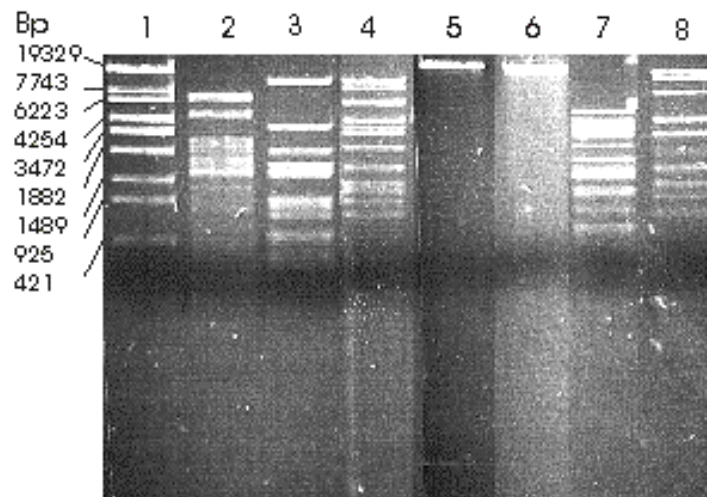


Abbildung 14 Agarose-Gelelektrophorese: Abschätzen der Genomgröße des Phagen PY100 durch unterschiedliche Verdauungen
1 Marker, 2 *HpaI*-Verdau, 3 *DraI*-Verdau, 4 *EcoRI*-Verdau, 5 *PstI*-Verdau, 6 *SmaI*-Verdau, 7 *Eco32I*-Verdau, 8 *BglI*-Verdau

4.2.4 Darstellung der Phagenproteine in der SDS-PAGE

Die Proteine des isolierten Phagen wurden entsprechend Punkt 3.10 aufbereitet, mit SDS-haltigem Probenpuffer aufgeköcht und mittels SDS-PAGE aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülgröße getrennt. Die Größen der einzelnen Proteinfractionen wurden anhand des mitgeführten Standardproteinmarkers abgeschätzt. Es zeigten sich sechs dominierende Proteinbanden (Abb. 15).

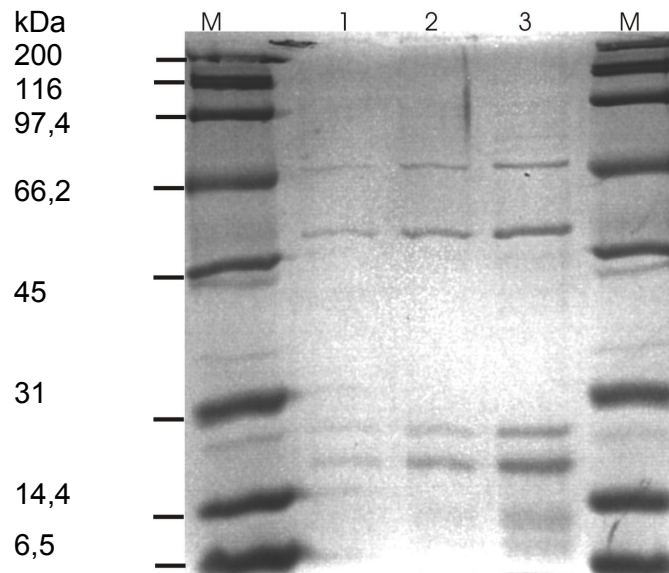


Abbildung 15 SDS-Page der Phagenproteine, Färbung Coomassieblau
M Marker, **Bahn 1** 20 µl, **2** 50µl, **3** 100µl Phagenlysat, **M** Marker

4.2.5 Wirtsspektrum PY 100

Um das Wirtsspektrum des Phagen PY 100 abzugrenzen, wurden verschiedene Wirtsstämme im Softagar-Overlaytest getestet. Hierbei wurden die zu testenden Stämme dem Softagar zugefügt und die Phagenverdünnungen im Spotttest getestet. Es wurde sowohl bei 28 °C als auch bei 37 °C überprüft, wobei die letztere Temperatur in jedem Falle die entscheidende war (Tab.14).

Tabelle 14 Überprüfung des Wirtsspektrum von PY 100 mittels Softagaroverlaytest

Stamm	Serovar / Biovar	Ergebnis Phagenlysat
<i>Y. enterocolitica</i>		
13169	O : 3	positiv
22509	O : 3	positiv
RKI111	O : 3	positiv
29211	O : 3	positiv
16814	O : 3	positiv
799/89	O : 3	positiv
738/84	O : 3	positiv
478/89	O : 3	positiv
<i>Y. enterocolitica</i>		
383	O : 9	positiv
31077	O : 9	positiv
31079	O : 9	positiv
31084	O : 9	positiv
H 705/83	O : 9	positiv
510/88	O : 9	positiv
219/91	O : 9	positiv
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		
	I	positiv
	II	positiv
	III	positiv
	IV	positiv
	V	positiv
	VI	positiv
	IA	positiv
<i>E.coli</i>		
DC 1120/3	091 :H -	negativ
DC 955/2	O128 :H 2	negativ
CB 6220	O146 : H21	negativ
CB 5807	O 157 : H7	negativ
CB 6373	026 : H11	negativ
DG 1120/1	090 : H21	negativ
DG 1186/2	ONT : H	negativ
DG 11173/3	Rauh :H10	negativ
CB 3537	048 : H21	negativ
CB 168	O111 : H -	negativ
CB 6591	O118 : H12	negativ
DG 914/1	O125 : H -	negativ
<i>Klebsiella oxytoca</i>		negativ
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		negativ
<i>Morganella morganii</i>	582/ 90	negativ
	647/ 90	negativ
<i>Proteus mirabilis</i>	827/ 90	negativ
	1013/ 90	negativ
<i>Proteus vulgaris</i>	568/ 91	negativ
<i>Shigella (Sh.) sonnei</i>	508/ 75	negativ
<i>Sh. flexnerii</i>	1a : Kauffmann	negativ
	6 : Boyd	negativ

Fortsetzung Tabelle 14 Überprüfung des Wirtsspektrum von PY 100 mittels Softagaroverlaytest

Stamm	Serovar / Biovar	Ergebnis Phagenlysat
<i>Sh. dysenteriae</i>	<i>Sh. dys.</i> (Shiga)	negativ
	<i>Sh. dys.</i> (Schmitz)	negativ
	Q 771	negativ
	Q 1167	negativ
<i>Sh. boydii</i>	170	negativ
	NCTC 965-58	negativ
<i>Salmonella</i>	<i>S. Typhimurium</i>	negativ
	<i>S. Brandenburg</i>	negativ
	<i>S. Thompson</i>	negativ
	<i>S. Infantis</i>	negativ
	<i>S. Oranienburg</i>	negativ
	<i>S. Enteritidis</i>	negativ
	<i>S. Panama</i>	negativ
	<i>S. Anatum</i>	negativ
	<i>S. Anatum</i> var. 15	negativ
	<i>S. Senftenberg</i>	negativ
<i>Enterobacter cloacae</i>	921/ 70	negativ
<i>Hafniae</i>		
<i>H. alvei</i>	522	negativ
<i>Citrobacter</i>		
<i>C. freundii</i>	764/ 79	negativ
<i>C. freundii</i>	1505/ 78	negativ
<i>Serratia</i>	532/ 90	negativ
<i>Edwardsiella tarda</i>	306/ 70	negativ
<i>Pseudomonas</i>		
<i>Ps. ssp</i>	933/ 89	negativ
<i>Ps. ssp</i>	950/ 89	negativ
<i>Aeromonas</i> (A.)		
<i>A. hydrophilia</i>		negativ
<i>A. caviae</i>		negativ
<i>A. hydrophilia anaerog.</i>	ATCC 15467	negativ
<i>Vibrio</i> (V.)		
<i>V. cholerae</i>	O :63	negativ
<i>V. parahaemolyticus</i>		negativ
<i>V. vulnificus</i>	O : 1	negativ
<i>V. cincinnatiensis</i>		negativ
<i>B) subtilis</i>		negativ
<i>Enterococcus</i> (E.) <i>faecalis</i>		negativ

Der Phage zeigt ein ungewöhnlich breites Wirtsspektrum innerhalb der Gattung *Yersinia*, das sogar spezieübergreifend zu sein scheint, da Versuche mit verschiedenen Stämmen von *Y. pseudotuberculosis* eine deutliche Lyse der Wirtsstämme zeigten. In Untersuchungen in der Arbeitsgruppe wurden weitere *Y. enterocolitica*-Stämme gefunden, die PY 100 gegenüber sensitiv waren. Hierzu gehörten die Stämme O:5,27; O:8 und einige Biovar 1A-Stämme unterschiedlicher Serovare. Dies ist ungewöhnlich, da Phagen in der Regel ein enges Wirtsspektrum haben.

Bei den beiden unterschiedlichen Temperaturen traten auch unterschiedliche Plaquegrößen auf. Bei 37 °C zeigten sich in der Regel große, klare Plaques, bei 28 °C hingegen waren die Plaques klein. Weiterhin wurden bei 37 °C weniger Plaques gefunden als bei 28 °C.

4.3 Zellkulturversuche

Yersinien ändern bei Adsorption an eukaryonte Zellen ihre Oberfläche. Um nun zunächst in vitro abschätzen zu können, ob eine Therapie mit dem Enterocolitacin auch bei Adhäsion der Yersinien an eukaryonte Zellen funktionieren kann, wurden Adhäsions- und Invasionsversuche am etablierten Zellkulturmodell durchgeführt. Die dazu verwendeten HEp2-Zellen gehören einer permanenten epithelialen Zelllinie der FU Berlin an. Die Zellkulturversuche wurden mit dem Enterocolitacin durchgeführt. Für den Phagen PY 100 erwies sich diese Art von in vitro-Versuchen als noch zu störanfällig. Als sensibler Stamm diente *Y. enterocolitica* 13169, der sowohl gegen den Phagen PY 100 als auch gegen das Enterocolitacin sensitiv ist.

4.3.1 Zellkulturversuche mit dem Enterocolitacin

Zunächst wurden verschiedene Enterocoliticinkonzentrationen sowohl im Adhäsions- als auch im Invasionsversuch getestet, um einen Hinweis auf sinnvolle Anwendungskonzentrationen zu erhalten. Die Inkubationszeit mit dem Enterocolitacin betrug bei allen Ansätzen eine Stunde. Die Adhäsionsversuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, die Invasionsversuche bei 37 °C, da die Produktion der für die Invasion notwendigen Proteine (Invasin, das Produkt des *inv*-Gens) einen temperaturabhängigen Vorgang darstellt und bei 37 °C hochreguliert wird. Die für die Adhäsion (*yad* A-Gen, kodiert für das *Yersinia*-Adhäsion) notwendigen Proteine hingegen werden bei 25 °C von der Bakterienzelle produziert.

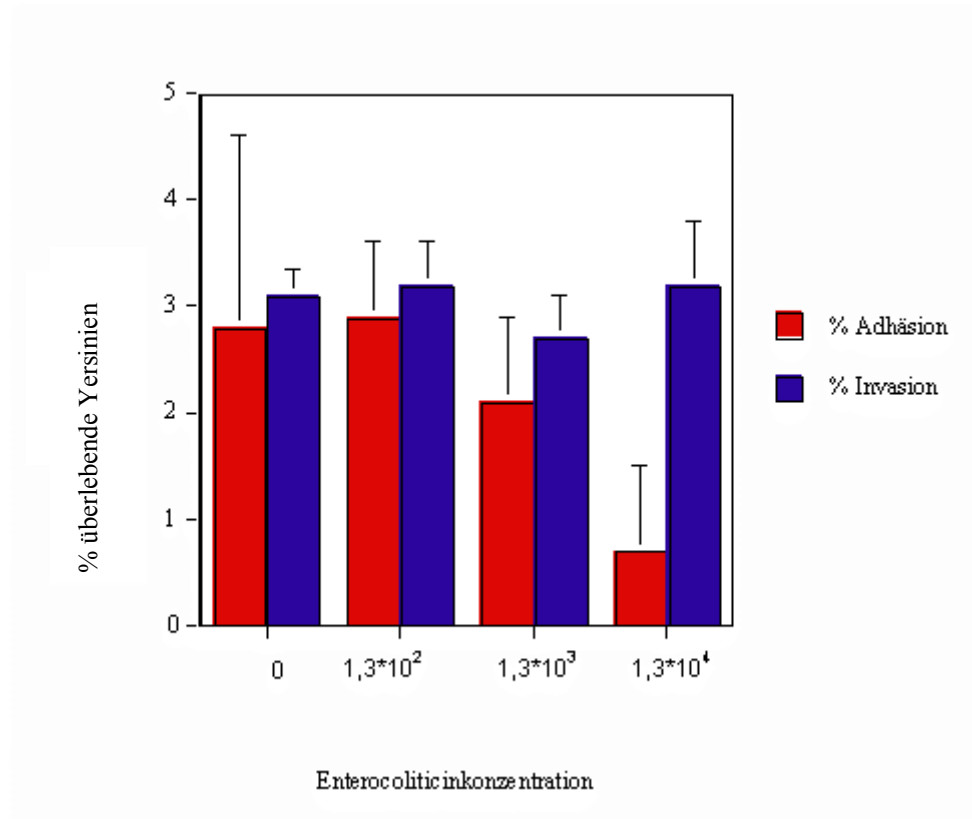


Abbildung 16 Prozent der überlebenden Yersinien in Abhängigkeit von der Enterocoliticinkonzentration nach Adhäsion bzw. Invasion an HEp2-Zellen

Deutlich zu erkennen ist die Wirksamkeit von Enterocoliticin bei steigender Konzentration in den Adhäsionsversuchen, während bei Invasionsversuchen kein Effekt durch steigende Enterocoliticinkonzentration zu erkennen ist (Abb. 16). Aufgrund dieses Ergebnisses wurden für alle weiteren Adhäsionsversuche eine Enterocoliticinkonzentration von $1,3 \times 10^4$ AU/ml gewählt, da sich hier eine deutliche Abnahme der überlebenden Yersinien zeigte. Zusätzlich wurde auch eine Konzentration von $1,3 \times 10^5$ AU/ml in den Adhäsionsversuchen eingesetzt, um eine sichere Abnahme der Überlebensrate durch Abtötung der Mehrzahl der adhären Yersinien erwarten zu können. Die Inkubationszeiten wurde in 30 min-Schritten von 30 Minuten auf 3 Stunden erweitert, um eine Zeitabhängigkeit in der Abtötungsfunktion des Enterocoliticins darstellen zu können, das Ergebnis ist Abb. 17 zu entnehmen.

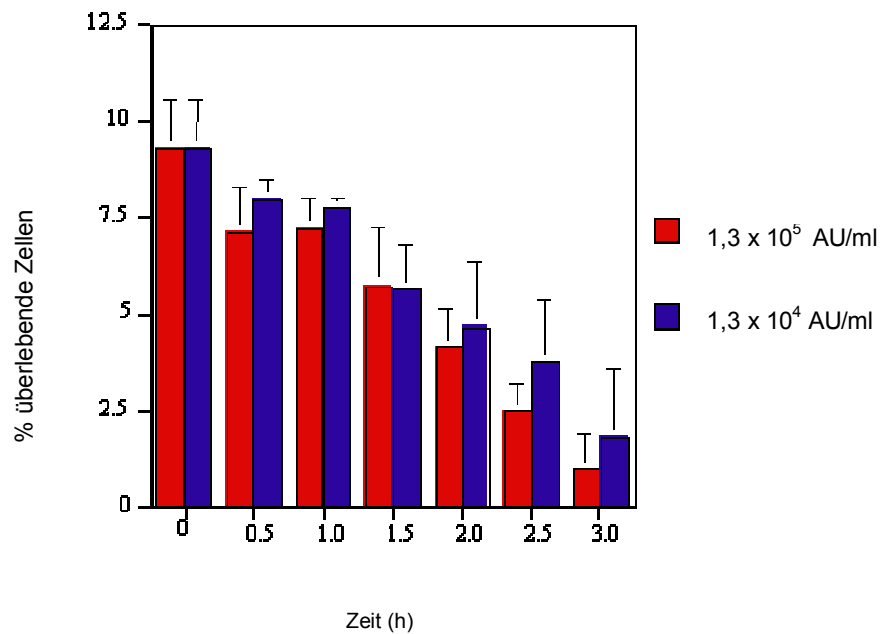


Abbildung 17 Effekt von Enterocoliticin auf die Überlebensrate von an eukaryonte Zellen adhärenen *Y. enterocolitica* 13169 in Abhängigkeit von der Zeit und der Konzentration des Enterocoliticins

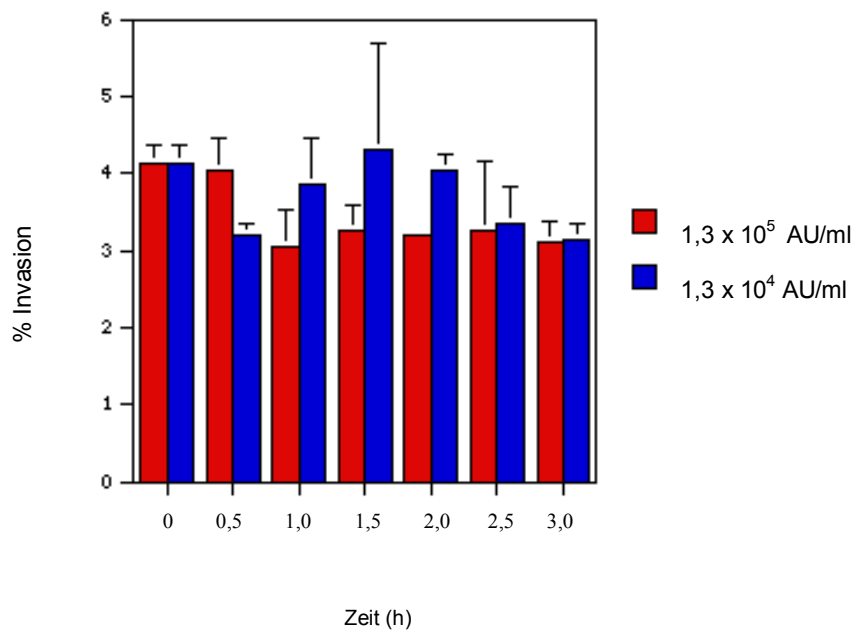


Abbildung 18 Effekt von Enterocoliticin auf in eukaryonte Zellen eingewanderte *Y. enterocolitica* 13169 in Abhängigkeit von der Zeit und der Konzentration des Enterocoliticins

Es konnte zwar keine vollständige Eradikation des Erregers im in-vitro-Adhäsionsversuch gezeigt werden, jedoch war eine Abnahme um mehr als 90 % der überlebenden Keime in

Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration klar zu erkennen. Auch die Abhängigkeit der Inkubationszeit war deutlich. Bei noch längeren Inkubationszeiten (24 Stunden) wuchsen die Bakterien in der Zellkultur wieder und die Abnahme war deutlich vermindert. Im Gegensatz dazu konnte im Invasionsversuch keine radikale Abnahme der überlebenden *Y. enterocolitica* 13169 erreicht werden. Die bei 37 °C in die HEp-2-Zellen eingewanderten Yersinien konnten durch das Enterocoliticin nicht erreicht werden, so dass es zu keiner Abtötung der eingewanderten Bakterien kommen konnte (Abb. 18).

Zur Einschätzung der bakteriziden Wirkung des Enterocoliticins im Vergleich zu einem gegen gramnegative Bakterien wirksamen Antibiotikum wurden Parallelversuche mit dem Aminoglycosid-Antibiotikum Gentamicin durchgeführt. Es wurden Konzentrationen des Gentamicins eingesetzt, die dem einfachen und dem zehnfachen MHK-Wertes von Gentamicin entsprachen. Der Effekt ist aus Abbildung 19 ersichtlich. Die MHK-Werte wurden in der Arbeitsgruppe ermittelt (SCHAUDINN, 2001).

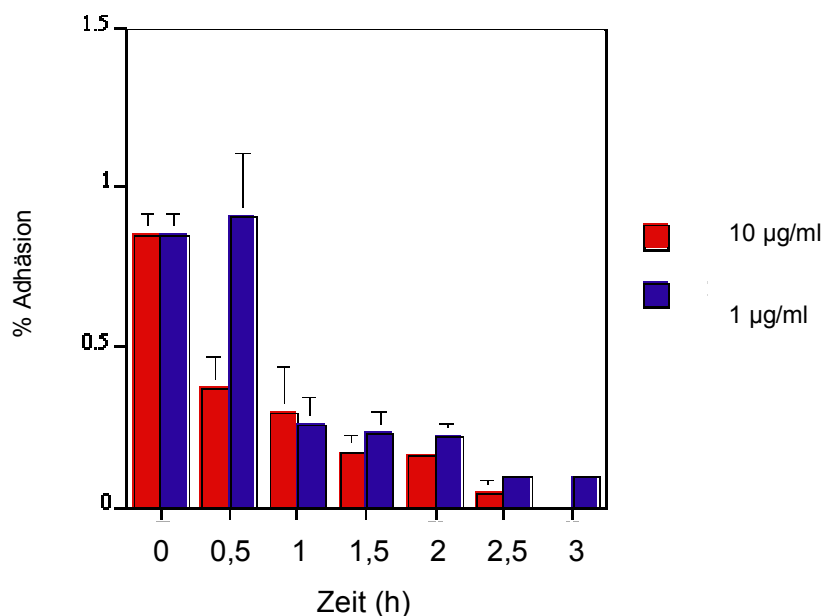


Abbildung 19 Effekt von Gentamicin auf die Überlebensrate von an eukaryonte Zellen adhärenzte *Y. enterocolitica* 13169 in Abhängigkeit von der Zeit und der Konzentration

Das Gentamicin zeigt im gleichen Zeitverlauf einen noch deutlicheren Abfall in der Anzahl der überlebenden Yersinien, ebenso wie bei den Enterocoliticinversuchen nimmt die Zahl der überlebenden Bakterien in Abhängigkeit von der Zeit und von der verwendeten Konzentration deutlich ab. Zumindest bei der Verwendung der niedrigeren Konzentration ist

eine vollständige Eradikation der Bakterien nicht zu erreichen. Jedoch ist die Wirkung des Gentamicin als nicht selektiv anzusehen, im Falle einer Therapie mit dem Antibiotikum würden nicht nur die Yersinien abgetötet werden, sondern auch die entsprechenden Bakterien der physiologischen Darmflora, was bei der Verwendung von Enterocolitacin nicht der Fall wäre.

4.3.2 Zellkulturversuche mit dem Phagen PY 100

Versuche, einen ähnlichen Ansatz sowohl für die Invasion als auch für die Adhäsion mit dem Phagen PY 100 als Therapeutikum durchzuführen, erwiesen sich als in dieser Art nicht durchführbar, da der Phage bei 20 °C, der Temperatur, die für die Adhäsionsversuche verwendet wird, keine lytische Aktivität besitzt. Auch im Softagaroverlay-Test zeigte sich der Phage bei 20 °C nicht in der Lage, Plaques zu bilden. Die Adhäsionsversuche werden bei Raumtemperatur durchgeführt, da dann die Proteine von den Yersinien exprimiert werden, die zur Adhäsion notwendig sind. Man kann dann davon ausgehen, dass ausschließlich Adhäsion an die eukaryonten Zellen stattfindet, da die Expression der Proteine, die zur Invasion notwendig sind, erst bei 37 °C erfolgt.

Auch im Invasionsversuch bei 37 °C zeigte der Phage keine therapeutische Wirksamkeit, es ist anzunehmen, dass der Versuchsansatz für den Phagen noch weiter verändert werden müsste, da dieser eventuell unspezifisch an Strukturen der eukaryonten Zellen bindet und somit für den Versuch selbst nicht mehr zur Verfügung steht. Die Testung der lytischen Phagenaktivität im Zellkulturtest erfordert daher noch weitere Arbeiten zur Optimierung.

4.4 Mausdiarrhoemodell-Therapieversuche

Erwartungsgemäß zeigten sich nach der *Y. enterocolitica*-Infektion mit einem Stamm des Serovar O:3 keine deutlichen klinischen Symptome einer Yersiniose bei den Mäusen. Im Gegensatz zu den mausletalen O:8-Stämmen verfügen *Y. enterocolitica* O:3 nicht über ein effizientes Eisenaufnahmesystem, so dass allenfalls ein weicher Kot nach der Infektion einstellte. Jedoch waren alle infizierten Tiere nach der Infektion latente Ausscheider und *Y. enterocolitica* 13169 konnte im Kot über Wochen hinweg auch ohne Anreicherungsverfahren nachgewiesen werden.

4.4.1 Tierpassage des Stammes *Y. enterocolitica* 13169

Es wird empfohlen, Bakterienstämme, die für Tierversuche verwendet werden sollen, zunächst durch mehrere Tierpassagen wieder virulent zu machen, da die vielfach im Labor passagierten Stämme zu stark an Laborbedingungen angepaßt sind (Mielke, persönliche Mitteilung).

Um den Stamm *Y. enterocolitica* 13169 für Tierversuche verwendbar zu machen, wurde ein Tier oral mit einer Dosis von 10^9 CFU/Tier infiziert, nach 24 h Inkubationszeit wurden die Organe präpariert und mit PBS-Puffer homogenisiert. Aus den Homogenisaten wurden dekadische Verdünnungsreihen mit PBS-Puffer hergestellt und jeweils 100 µl auf CIN-Platten ausplattiert und 48 h bei 28 °C bebrütet.

Die Quantifizierung der Keimzahl erfolgte auf einem *Yersinia*-Selektivagar (CIN-Agar nach Schiemann). Hierbei zeichnen sich die Yersinien durch eine typische Wachstumsform aus, die Kolonien erscheinen in ihrem Zentrum stark rosarot angefärbt, umgeben ist dieses Zentrum von einem durchsichtigen Rand („Kuhaugenförmig“). Stichprobenartig wurden die Kolonien durch Objektträgeragglutination und 0:3 Antiserum (SIFIN, Berlin) auf Zugehörigkeit zum richtigen Serovar geprüft.

Die auf den Platten gewachsenen *Yersinia*-Kolonien wurden durch Präparation des Virulenzplasmids überprüft, zusätzlich wurde der Test auf Vorhandensein des Virulenzplasmides durchgeführt (siehe 3.4). Bei positivem Ergebnis wurde aus dem passagierten Stamm ein neues Inokulum hergestellt und erneut eine Maus oral infiziert. Anschließend wurde genauso wie beim ersten Tier verfahren. Nach jeder Tierpassage ließen sich höhere Keimzahlen im Magen-Darm-Trakt nachweisen.

4.4.2 Verlauf der Infektion mit *Y. enterocolitica* 13169

Zur Infektion der Tiere wurde der orale Weg gewählt, da dies bei einer natürlichen Infektion auch die Eintrittspforte für die Yersinien darstellt. Die Infektion erfolgte per Knopfkanüle mit einem Volumen, welches das Magenvolumen der Maus nicht übersteigt.

Um den Verlauf der Infektion mit *Y. enterocolitica* 13169 nachvollziehen zu können, wurde zunächst eine orale Infektion bei Balb/C- Mäusen durchgeführt, bei der jede Maus aus einer Gruppe von fünf Mäusen eine Infektionsdosis von 6×10^8 CFU *Y. enterocolitica* 13169 erhielt. Das Inokulum wurde nach Punkt 3.20.2.1 hergestellt und über eine Knopfkanüle oral verabreicht.

In festgelegten Zeitabständen wurden Tiere getötet, die entsprechenden Organe in PBS homogenisiert, die Homogenisate wurden in Eppendorfgefäße abgefüllt und über Nacht bei 4

°C gelagert. Nach 12 Stunden wurden aus den Homogenisaten dekadische Verdünnungsreihen hergestellt und jeweils 100 µl ausplattiert. Die Erfassung der Keimzahlen erfolgte wie unter Punkt 3.20.2.2 dargestellt. Bei allen Tieren wurden an bestimmten Tagen Kotproben eingesammelt, homogenisiert und in bereits beschriebener Weise aufgearbeitet.

Abbildung 20 Schema Probennahme bei Untersuchung des Infektionsverlaufs

	Tag der Infektion												
	0 h	6 h	1	3	6	14	17	21	24	28	31	35d	
Kotprobe	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Organentnahme					x	x		x		x		x	

Der Verlauf der Infektion wurde über 35 Tage beobachtet (Abb. 20), wobei die Keime, die in den Organen Leber, Milz, Niere und Lymphatischer Rachenring bereits nach 6 h in hoher Zahl zu finden waren, auch sehr schnell wieder absanken. Bereits nach 48 h waren hier fast keine Yersinien mehr zu finden. Dahingegen war der Magen-Darm-Trakt bis zum Ende der Versuchsreihe mit Yersinien deutlich besiedelt. Sowohl in Caecum als auch im Kot waren nach 21 Tagen noch Keimzahlen im Bereich von 10^5 CFU nachzuweisen, im Kot waren auch nach 28 d Yersinien nachzuweisen im Bereich von 10^2 CFU/g Kot. Klinisch kranke Tiere waren zu keinem Zeitpunkt des Versuchs erkennbar.

Nach 6, 14, 21, 28 und 35 Tagen wurde jeweils eine Maus getötet und die Organe Leber, Niere, Milz, lymphatischer Rachenring, Ileum, Caecum und der Kot auf das Vorhandensein von Yersinien untersucht. In bereits beschriebener Weise wurden die Organe aufgearbeitet und die Homogenisate in Aliquots auf CIN-Agar nach Schiemann ausplattiert und 48 h bei 28 °C bebrütet. Erwartungsgemäß fanden sich in den Organen keine Yersinien, die Ausnahme bildeten der Gastrointestinaltrakt und der Kot. Hier waren alle Tiere über den gesamten untersuchten Zeitraum hinweg latente Ausscheider.

Es waren in den untersuchten Darmabschnitten über einen längeren Zeitraum hinweg Yersinien zu finden, was ein deutlicher Hinweis darauf ist, dass es sich bei diesem Stamm um einen pathogenen Stamm handelt. Biovar 1A-Stämme zeichnen sich dadurch aus, dass sie bereits nach wenigen Tagen wieder aus dem Magen-Darm-Trakt eliminiert werden.

4.4.3 Therapie mit Enterocoliticin


Das Inokulum wurde, wie unter Punkt 3.20.2.1 beschrieben, vorbereitet. Pro Maus wurden 0,5 ml Inokulum mit einer Infektionsdosis von $1,4 \times 10^8$ CFU/ml per Knopfkanüle verabreicht, insgesamt wurden 50 Tiere infiziert. Eine Stichprobengruppe beinhaltete 5 Mäuse. Die

Kontrollgruppe erhielt ausschließlich die Infektionsdosis, Therapiegruppe 1 erhielt nach einer Stunde Inkubationszeit eine Dosis von 0,5 ml Enterocoliticin mit einer Aktivität von $8,2 \times 10^5$ AU/ml oral verabreicht, Therapiegruppe 2 bekam eine tägliche Enterocoliticingabe mit einer Aktivität von $4,1 \times 10^5$ AU/ml, ebenfalls per os, verabreicht. Aus jeder Gruppe wurde nach einer Zeitvorgabe von 6 h, 24 h, 3 d und 6 d jeweils eine Stichprobengruppe getötet und die entsprechenden Organe wurden, wie unter 3.20.2.2 beschrieben, verarbeitet (Abb. 21). Es wurden aus den entstandenen Verdünnungsreihen der Homogenisate jeweils 100 µl auf CIN-Agar ausplattiert (jeweils als Doppelbestimmung) und 48 h bei 28 °C bebrütet. Die Kolonien wurden ausgezählt und ein willkürlich ausgewählter Querschnitt auf die Zugehörigkeit zum Serovar 0:3 mittels Objektträgeragglutinationstest überprüft. Alle getesteten Kolonien gehörten zum *Y. enterocolitica* Serovar O:3.

Abbildung 21 Infektionsschema für den Therapieversuch mit dem Enterocoliticin

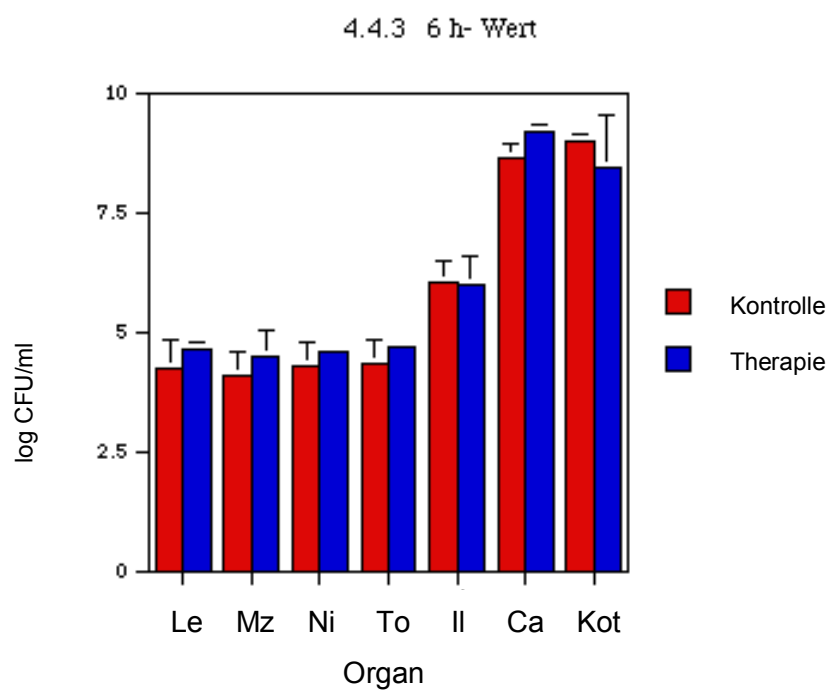
(T = Tiere, Inf. = Infektion)

	Tag der Infektion					
	0 h	1 h	6 h	24 h	3 d	6 d
Kontrollgruppe			5T	5T	5T	5T
Therapiegruppe 1			5T	5T	5T	5T
Therapiegruppe 2					5T	5T



Wie aus Abb. 22 a - d ersichtlich wird, lassen sich keine deutlichen Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den beiden Therapiegruppen erkennen. Zusätzliche Versuche, die Enterocoliticinaktivität in den einzelnen Homogenisaten des Gastrointestinaltrakts durch einen Softagar-Overlaytest zu detektieren oder durch einen Western Blot mit anschließender Immunotechnik zu finden, schlugen fehl. Es ist könnte sein, dass das Enterocoliticin unspezifisch, etwa an Verdauungspartikel im Magen-Darm-Trakt gebunden wird und so nicht mehr an seinen Rezeptoren am Bakterium andocken kann, demzufolge kann das Enterocoliticin seine Aktivität nicht entfalten.

a)



b)

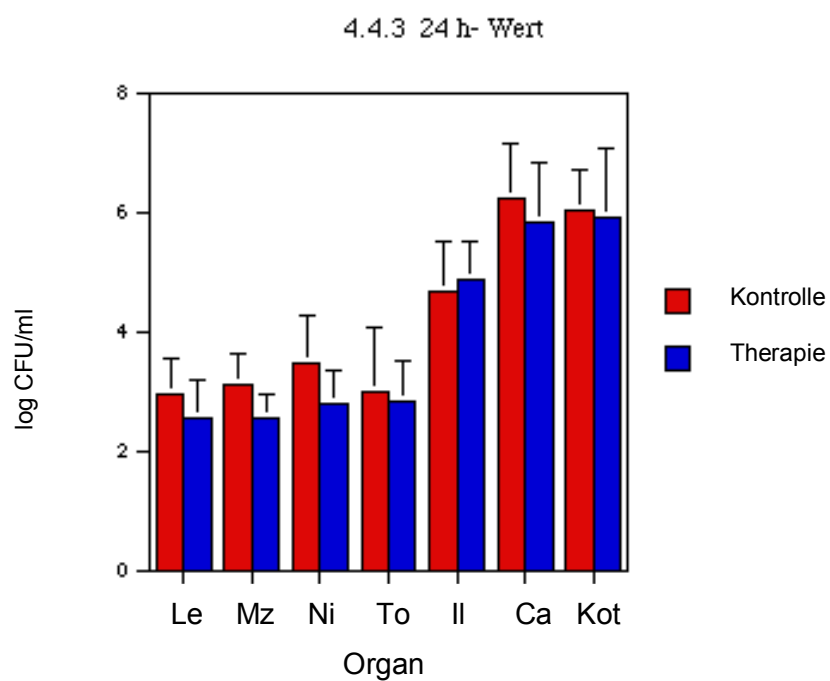
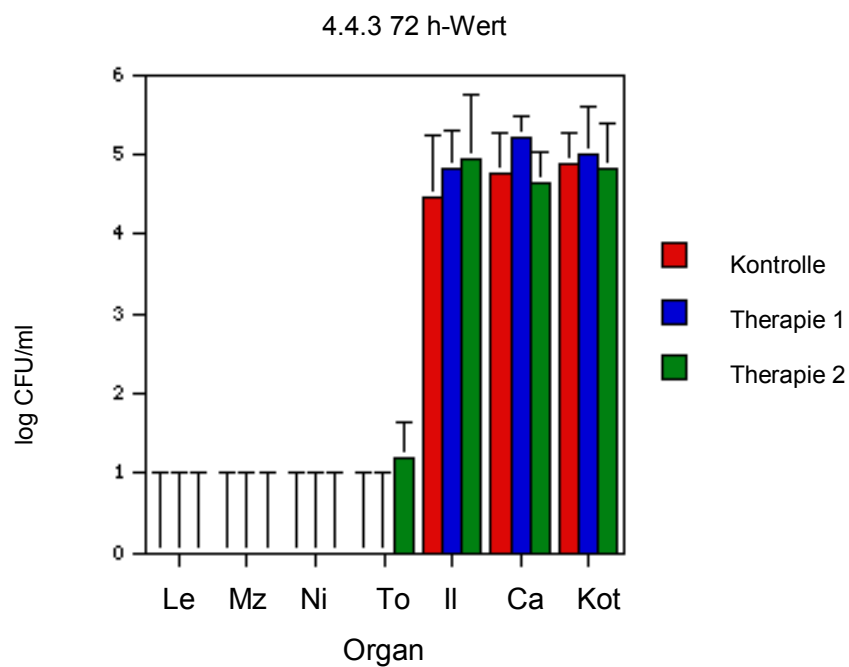


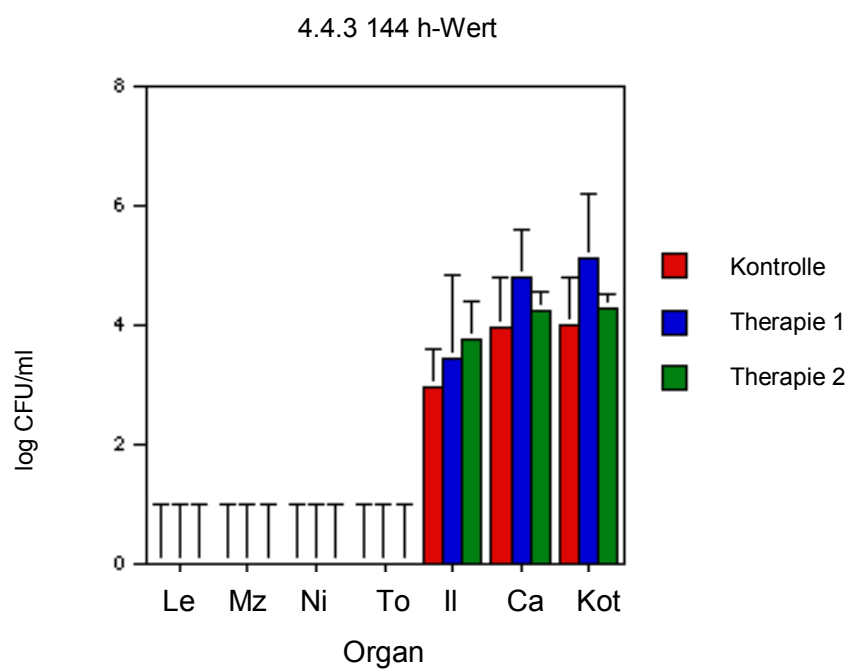
Abbildung 22 Therapeutische Enterocoliticingabe

untersuchte Organe: Leber (Le), Milz (Mz), Niere (Ni), Tonsillen (To), Ileum (Il), Caecum (Ca), Kot

c)



d)



Fortsetzung Abbildung 22 Therapeutische Enterocoliticingabe, pro Gruppe wurden 5 Mäuse getötet, aus den Keimzahlen der Organe wurde der dekadische Logarithmus gebildet und diese Werte über das arithmetisch Mittel zusammengefaßt. 1 wurde als Nachweisgrenze angenommen (entspricht 10 CFU/ml)

Unklar ist ebenfalls, ob nicht doch schon eine Inaktivierung bzw. eine unspezifische Bindung im Magenbereich stattfindet, obwohl Versuche sowohl mit dem Inhalt von Schweinemägen als auch mit dem Inhalt des Duodenum gezeigt haben, dass die Aktivität des Enterocoliticin während einer Inkubationszeit von bis zu 12 Stunden nicht vermindert wird.

4.4.4 Therapieversuch mit dem Phagen PY 100

Der Weg auf der Suche nach weiteren Alternativen zur Antibiotikatherapie führt fast unweigerlich zur Phagentherapie. Dieser Ansatz hat den großen Vorteil, dass der Phage bei erfolgreicher Infektion repliziert und so nur in einer geringen Dosis appliziert werden muß. Trotz geringer Dosis läßt sich so ein hoher Wirkspiegel im Tier erreichen.

4.4.4.1 Therapieversuch mit dem Phagen PY 100-Gabe intraperitoneal

Es wurden wiederum 50 Tiere oral mit *Y. enterocolitica* 13169 infiziert. Die Infektionsdosis betrug $7,5 \times 10^8$ CFU/Tier. Der Therapieversuch erfolgte anhand folgendem Schema: die Kontrollgruppe erhielt ausschließlich die Infektionsdosis, Therapiegruppe 1 erhielt 1 Stunde nach der Infektion eine einmalige Phagendosis von $1,9 \times 10^7$ PFU, intraperitoneal appliziert, Therapiegruppe 2 erhielt ihre Phagendosis erst 24 h nach der Infektion ebenfalls auf intraperitonealem Wege. Eine Stichprobengruppe beinhaltete wiederum fünf Tiere.

Aus jeder der drei Gruppen wurde nach 6 h, 12 h, 3 d und 6 d jeweils eine Stichprobengruppe getötet und die entsprechenden Organe in bereits beschriebener Weise aufbereitet und die Homogenisate in Form von Doppelbestimmungen ausplattiert, 48 h bebrütet und die Kolonien ausgezählt (Abb. 23).

Abbildung 23 Schema Probennahme Infektionsverlauf

(T = Tiere, Inf. = Infektion)

	0 h	1 h	6 h	12 h	24 h	3 d	6 d
Kontrollgruppe			5 T	5 T		5 T	5 T
Therapiegruppe 1			5 T	5 T		5 T	5 T
Therapiegruppe 2						5 T	5 T

↑ ↑ ↑

Inf. Applika- Applika-

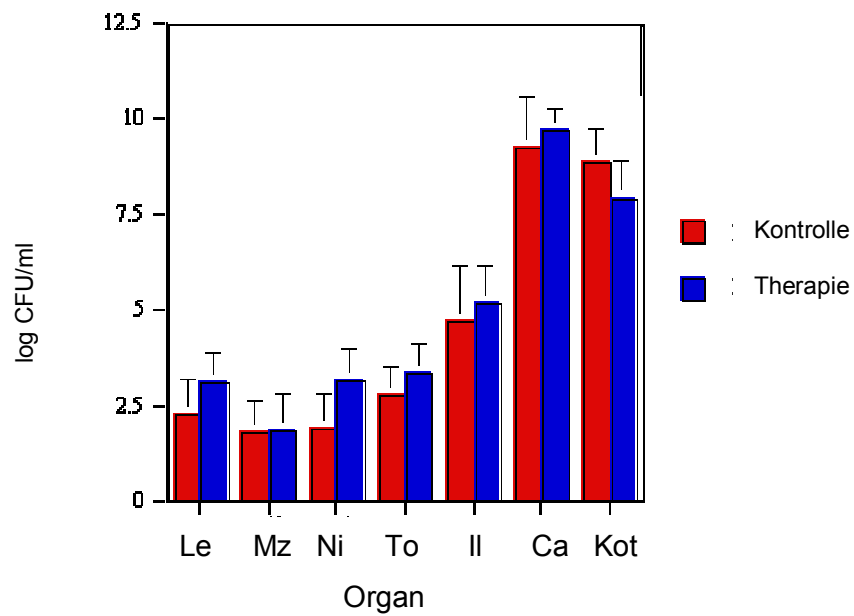
 tion 1 tion 2

Es zeigten sich auch hier auf den ersten Blick keine eindeutigen Reduktionen in der ermittelten Keimzahl. Sowohl der Infektionsverlauf der Kontrollgruppe als auch der

Infektionsverlauf der Therapiegruppe 1 sehen fast identisch aus, lediglich Therapiegruppe 2 weicht im Verlauf etwas ab (Abb. 24 a – d).

a)

4.4.4.1 6 h-Wert



b)

4.4.4.1 24 h-Wert

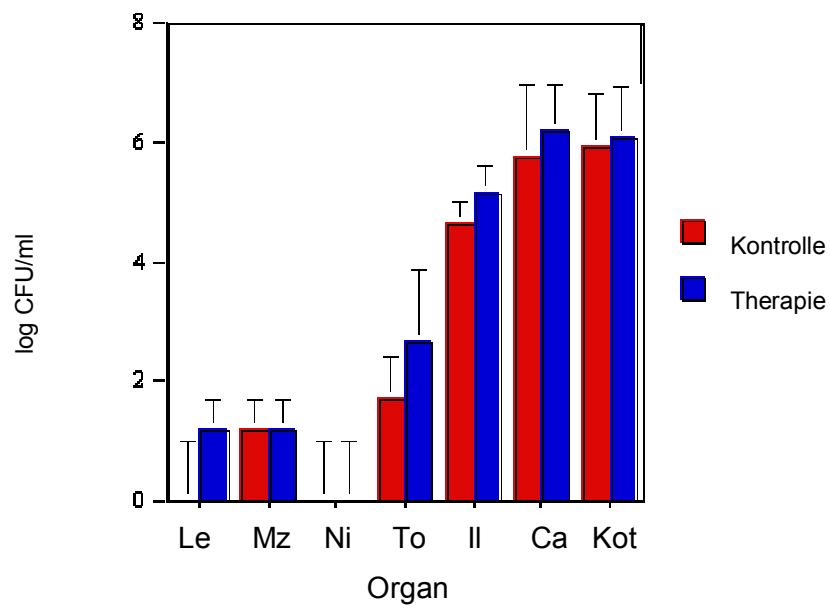
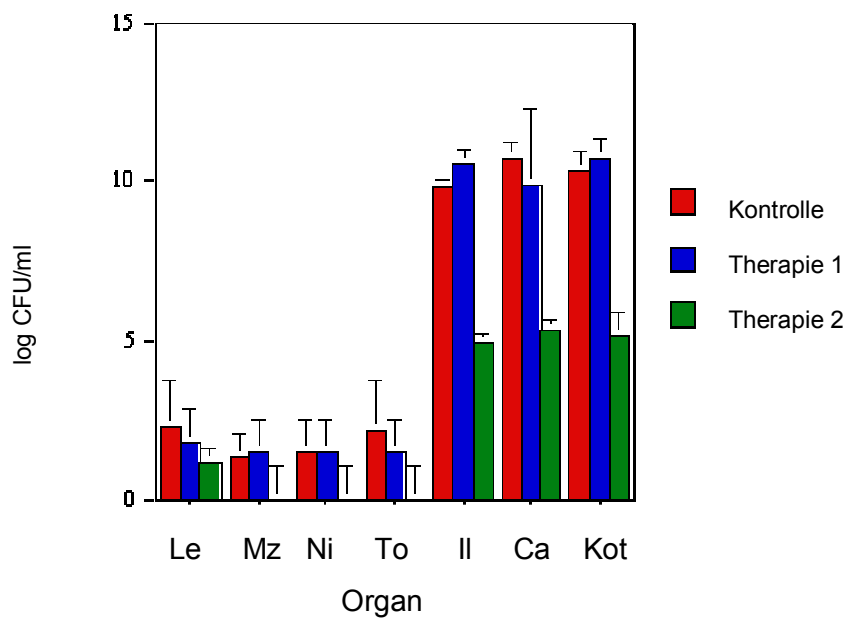


Abbildung 24 Keimzahlen nach therapeutischer Phagengabe

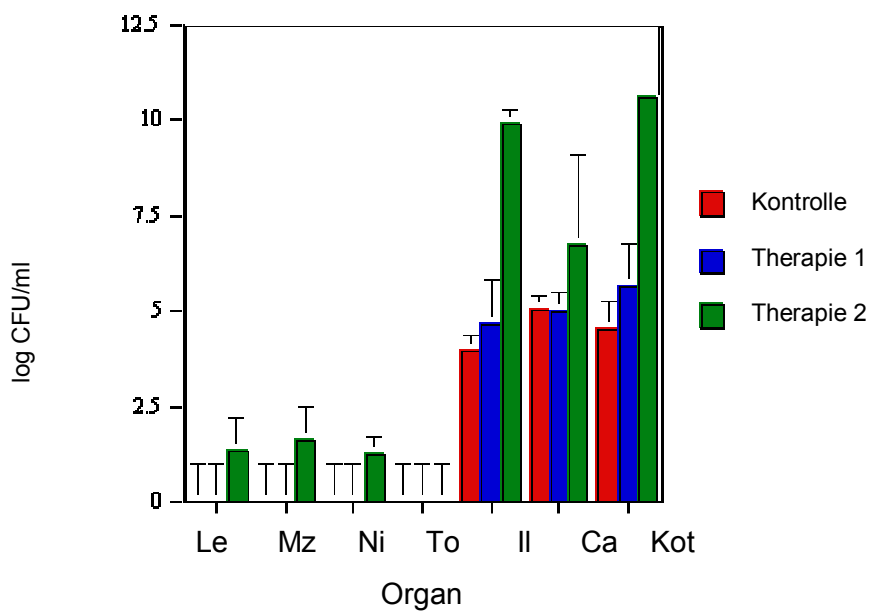
c)

4.4.4.1 72 h-Wert



d)

4.4.4.1 144 h-Wert



Fortsetzung Abbildung 24 Keimzahlen nach therapeutischer Phagengabe (1 als Nachweisgrenze angenommen, entspricht 10 CFU/ml)
 untersuchte Organe: Leber (Le), Milz (Mz), Niere (Ni), Tonsillen (To), Ileum (Il), Caecum (Ca), Kot

Therapiegruppe zwei lässt eine längerfristige Absackung der Keimzahl erkennen, bei der es allerdings nicht bleibt, sondern der ein Wiederanstieg der Keimzahl auf höhere Werte als bei Therapiegruppe 1 zur vergleichbaren Zeit folgt.

4.4.4.2 Einmalige Phagengabe intraperitoneal

Es wurden 60 Mäuse nach bereits genanntem Schema mit dem vorbereiteten Inokulum infiziert, sie erhielten eine Dosis $2,8 \times 10^9$ CFU pro Tier oral verabreicht. Kontrollgruppe 1 erhielt ausschließlich die Infektionsdosis, einer weiteren Kontrollgruppe (Kontrollgruppe 2) wurde nur die Phagendosis intraperitoneal appliziert. Die Therapiegruppe erhielt die Infektionsdosis mit *Y. enterocolitica* 13169 per os, sowie nach 1 Stunde die Phagendosis intraperitoneal verabreicht. Es wurden $3,5 \times 10^8$ PFU pro Tier appliziert. Eine Stichprobengruppe enthielt wieder 5 Tiere. Es wurde jeweils aus jeder Gruppe eine Stichprobengruppe zu vorher festgelegten Zeiten getötet: nach 6, 12, 24, 48 Stunden. Die Tiere wurden seziert, die Organe wie bereits beschrieben, verarbeitet, und die hergestellten Homogenisate verdünnt und in Aliquots von jeweils 100 µl in Doppelbestimmungen auf CIN-Agar ausplattiert (Abb. 25).

Abbildung 25 Infektionsschema, einmalige intraperitoneale Phagengabe

(T = Tiere, Inf. = Infektion)

	0 h	1 h	6 h	12 h	24 h	48 h
Kontrollgruppe 1			5 T	5 T	5 T	5 T
Kontrollgruppe 2			5 T	5 T	5 T	5 T
Therapiegruppe			5 T	5 T	5 T	5 T

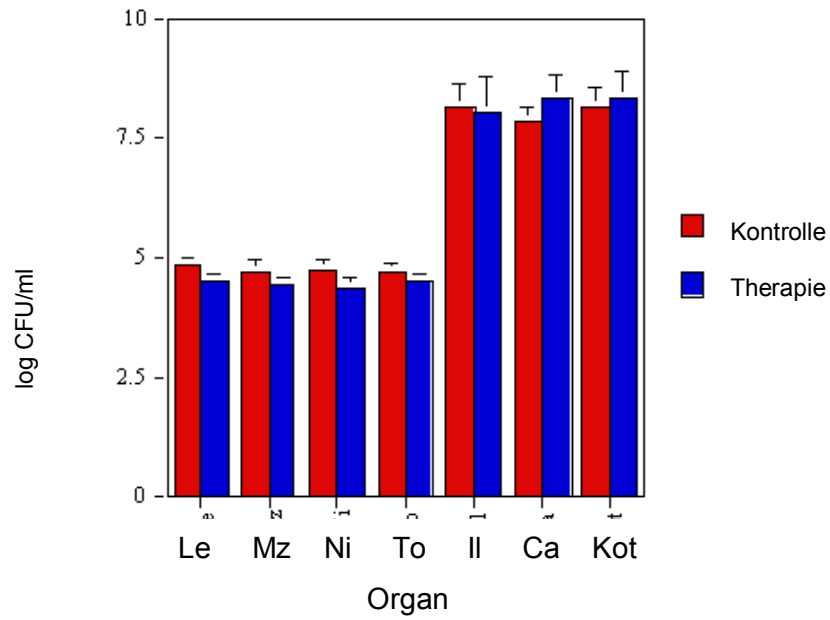
↑ ↑
 Inf. Applikation

In allen Organen war nach 6 h ein signifikanter Phagentiter festzustellen, der allerdings nach 24 h schon wieder deutlich abnahm, nach 48 h war nur noch sehr vereinzelt ein Phagentiter festzustellen. Die Verteilung der Phagen und ihre Vermehrung im Organismus verliefen sehr rasant, da schon nach kurzer Zeit (bereits nach 6 h) sich in allen Organen signifikante Phagentiter feststellen ließen. Allerdings scheint auch die Clearance sehr schnell zu funktionieren, da der Titer auch sehr schnell wieder abnahm, am längsten waren Titer in der Milz nachzuweisen.

Der Verlauf der Infektion in der Therapiegruppe verlief ähnlich dem der Kontrollgruppe, die nur die Infektionsdosis erhielt. Es lässt sich keine signifikante Abnahme in der Keimzahl feststellen (Abb. 26 a – d).

a)

4.4.4.2 6 h-Wert



b)

4.4.4.2 12 h-Wert

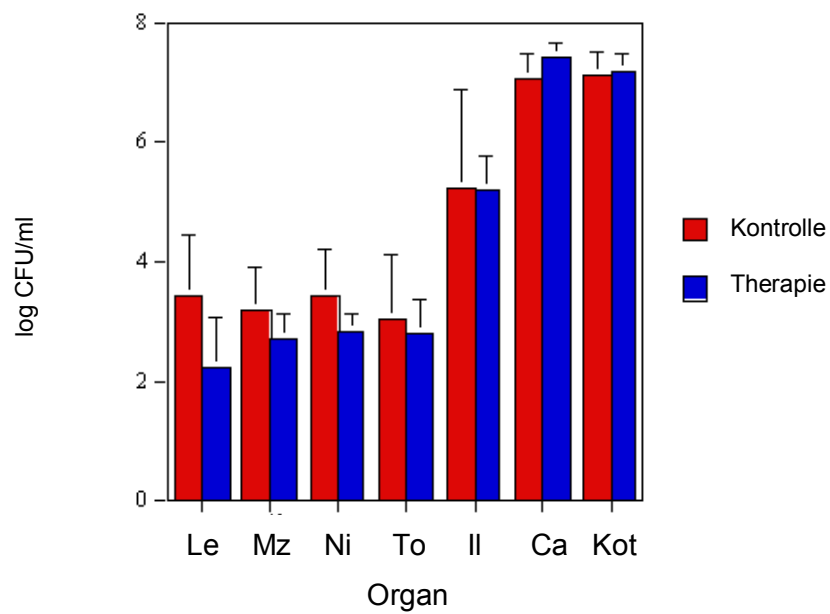
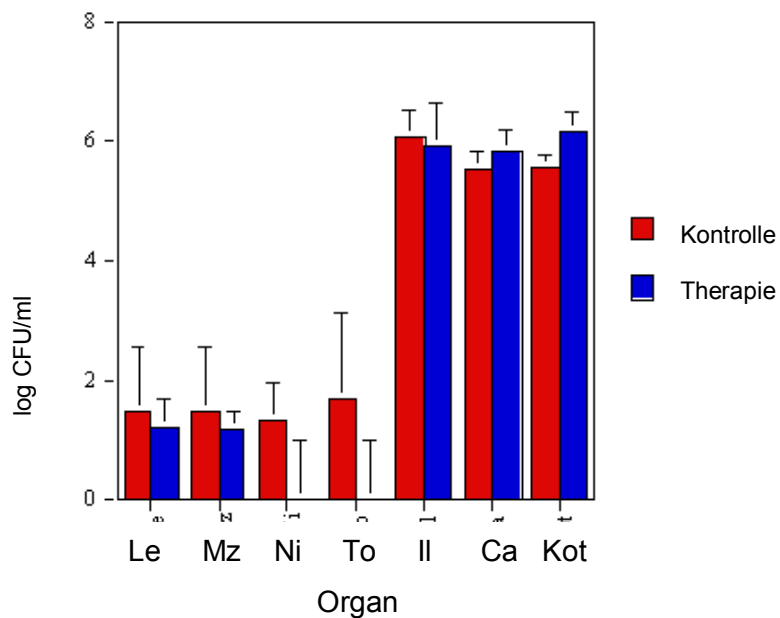


Abbildung 26 Einmalige intraperitoneale Phagengabe

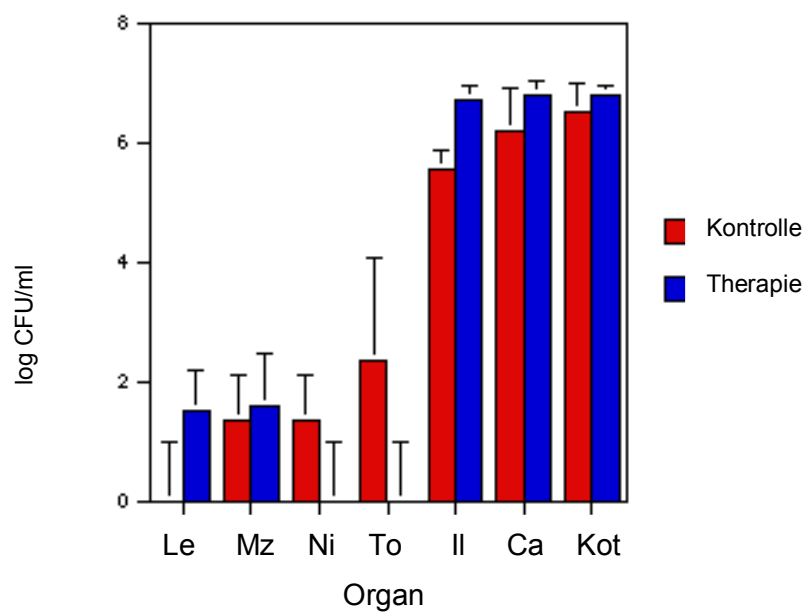
c)

4.4.4.2 24 h-Wert



d)

4.4.4.2 48 h-Wert



Fortsetzung Abbildung 26 Einmalige intraperitoneale Phagengabe, es wurden 10 CFU/ml als Nachweisgrenze angenommen (entspricht dem Wert 1 der logarithmierten Skala)
 untersuchte Organe: Leber (Le), Milz (Mz), Niere (Ni), Tonsillen (To), Ileum (Il), Caecum (Ca), Kot

4.4.4.3 Therapieversuch mit dem Phagen PY 100, Gabe oral

4.4.4.3.1 Therapieversuch, einmalige Phagengabe oral

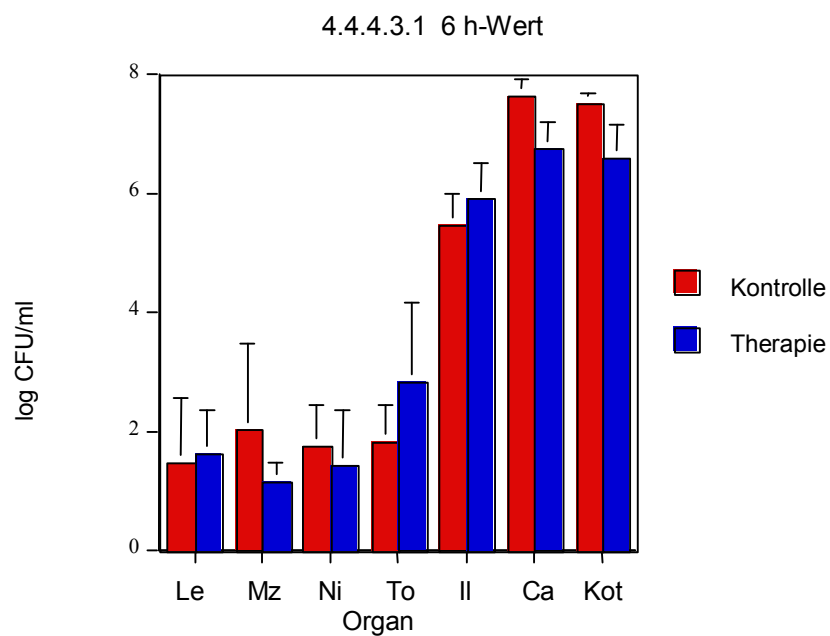
Um die Phagen an ihrem eigentlichen Wirkungsort, dem Gastrointestinaltrakt, einzusetzen, wurden die therapeutischen Dosen nun statt der intraperitonealen Gabe oral verabreicht. Um die Degradation der Phagenpartikel während der Magen-Darm-Passage auf ein Minimum zu reduzieren, wurde die Magensäure vor der Phagengabe mit 0,15 M NaH_2CO_3 abgepuffert. Hierzu erhielten die Mäuse 15 – 20 min vor der Phagenapplikation eine Dosis von 0,5 ml Puffer, danach wurde die Phagendosis 4×10^{10} PFU pro Tier verabreicht, ebenfalls ein Volumen von 0,5 ml. Die Kontrollgruppe 1 wurde nur mit einer Dosis von 10^9 CFU pro Maus infiziert, Kontrollgruppe 2 erhielt nur das Phagenlysat, die Therapiegruppe erhielt sowohl Inokulum als auch das Phagenlysat nach vorheriger Puffergabe eine Stunde nach der Infektion. Wieder waren in jeder Stichprobengruppe 5 Tiere enthalten, es wurde aus jeder Gruppe nach 6 h, 12 h, 24 h und 48 h jeweils eine Stichprobengruppe getötet, die Tiere seziert und die Organe wie bereits unter 3.20.2.2 beschrieben verarbeitet und die Verdünnungen in Doppelbestimmungen ausplattiert. Nach 48 h wurden die Kolonien ausgezählt (Abb. 27).

Abbildung 27 Infektionsschema für einmalige orale Phagengabe
(T = Tiere, Inf. = Infektion)

	0 h	1 h	6 h	12 h	24 h	48 h
Kontrollgruppe 1			5 T	5 T	5 T	5 T
Kontrollgruppe 2			5 T	5 T	5 T	5 T
Therapiegruppe			5 T	5 T	5 T	5 T
	↑	↑				
	Inf. Applikation					

Auch hier zeigten sich keine deutlichen Absenkungen der Keimzahl (Abb. 28 a – d).

a)



b)

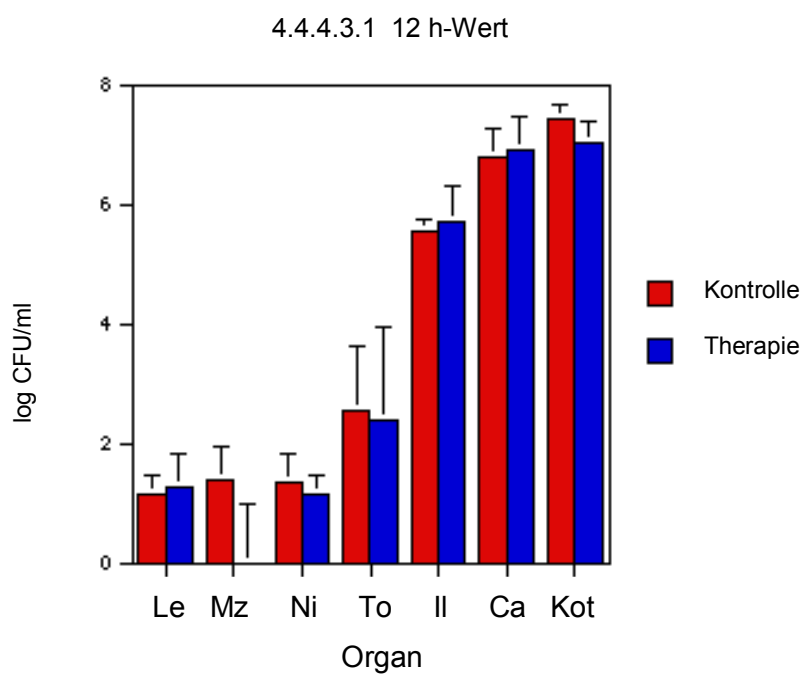
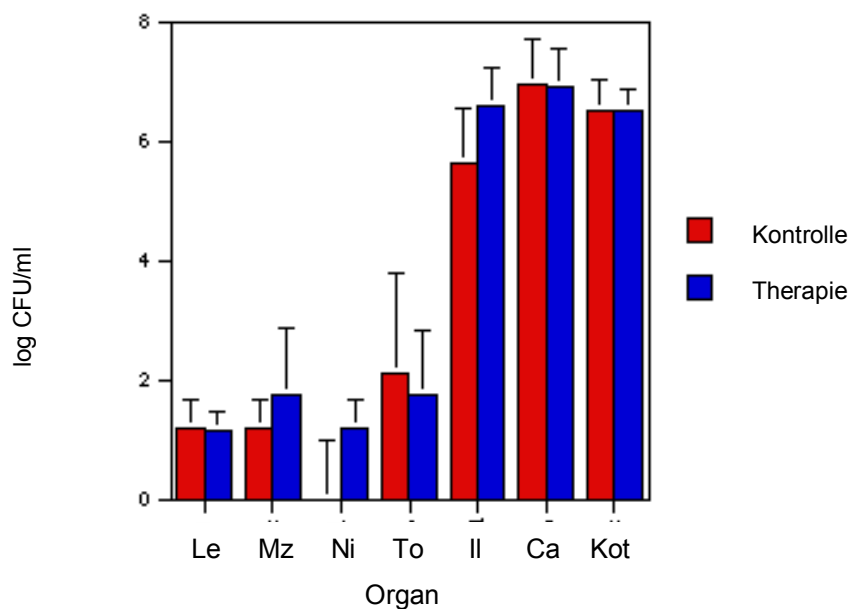


Abbildung 28 einmalige Phagengabe oral

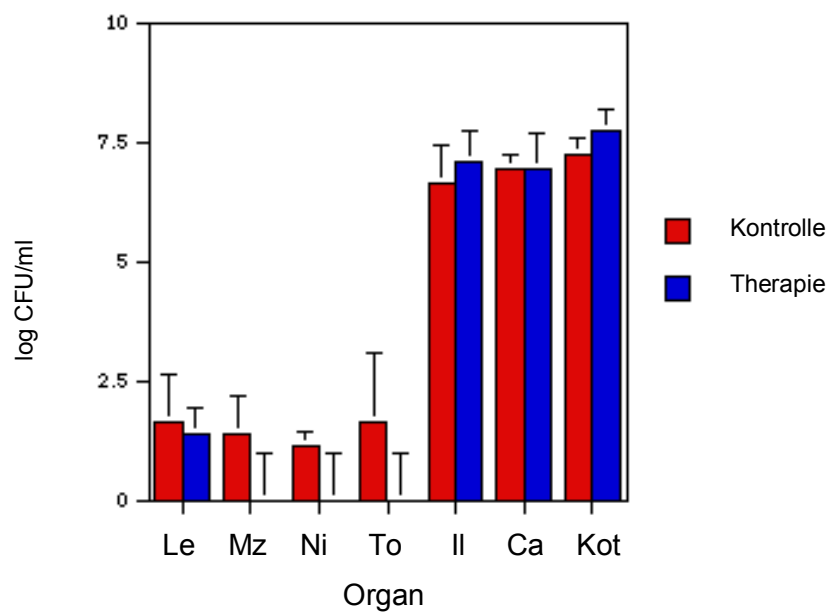
c)

4.4.4.3.1 24 h-Wert



d)

4.4.4.3.1 48 h-Wert



Fortsetzung Abbildung 28 einmalige Phagengabe oral, 1 wurde als Nachweisgrenze angenommen (entspricht 10 CFU/ml)
 untersuchte Organe: Leber (Le), Milz (Mz), Niere (Ni), Tonsillen (To), Ileum (Il), Caecum (Ca), Kot

4.4.4.3.2 Therapieversuch mit PY 100-Gabe oral, mehrfache Gabe

Um überhaupt eine Abnahme der Keimzahl zu provozieren, wurde die Phagendosis mehrfach verabreicht.

Dieser Versuchsplan entsprach soweit dem der einmaligen Phagenapplikation, wie bereits unter Punkt 4.4.4.3.1 beschrieben, lediglich die Phagengabe erfolgte nicht nur einmalig, sondern wurde dreimal wiederholt, wobei bei jeder Applikation eine Abpufferung der Magensäure vorausging. Die Infektionsdosis betrug $1,82 \times 10^9$ CFU pro Tier. Die erste Phagengabe erfolgte 1 h nach der Infektion, die drei folgenden Applikationen erfolgten jeweils im Abstand von 24 h, die Phagendosis pro Tier betrug $1,85 \times 10^{10}$ PFU/ Tier. Die Kontrollgruppe erhielt nur die Infektionsdosis, die Therapiegruppe erhielt ihre Phagendosis im Anschluß an die Puffergabe. Es wurden pro Gruppe 25 Tiere infiziert, nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 170 h wurde jeweils eine Stichprobengruppe getötet, die Organe verarbeitet und die Keimzahlen in Doppelbestimmungen festgestellt (Abb. 29).

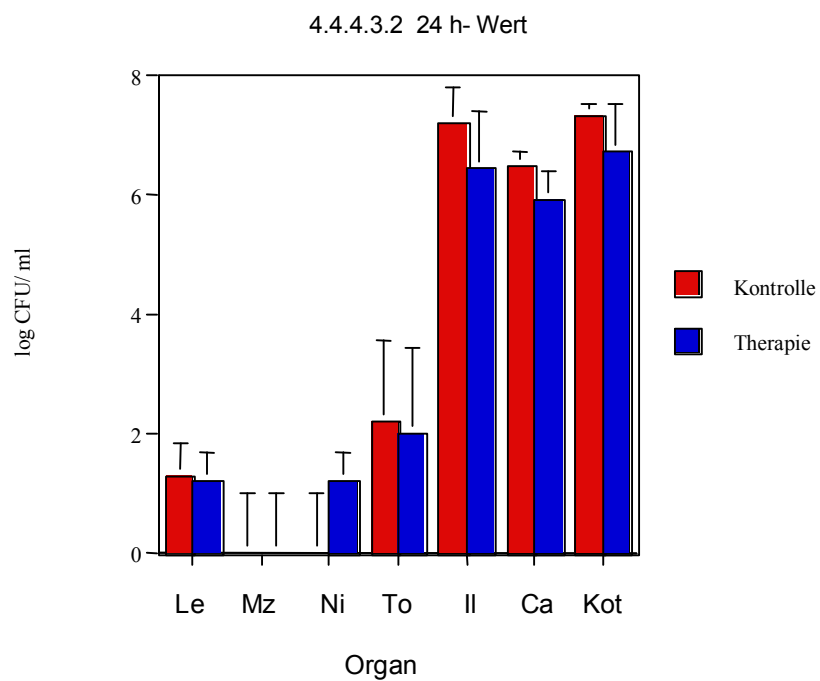
Abbildung 29 Infektionsschema: mehrfache orale Phagengabe

(T = Tiere, Inf. = Infektion)

	0 h	1 h	24 h	48 h	72 h	96 h	170 h
Kontrollgruppe			5 T	5 T	5 T	5 T	5 T
Therapie			5 T	5 T	5 T	5 T	5 T
	↑	↑	↑	↑	↑		
	Inf.		Applikation				

Eine signifikante Abnahme der Keimzahlen war nicht zu erkennen, auch konnten in den verschiedenen Organen erstaunlicherweise nur verhältnismäßig geringe Phagentiter durch einen Softagar-Overlaytest festgestellt werden (Abb. 30 a – e).

a)



b)

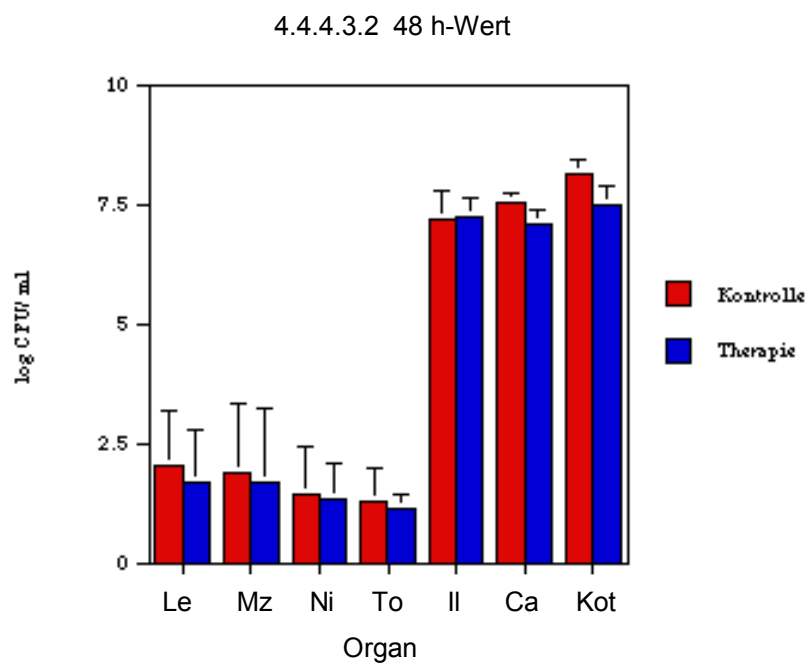
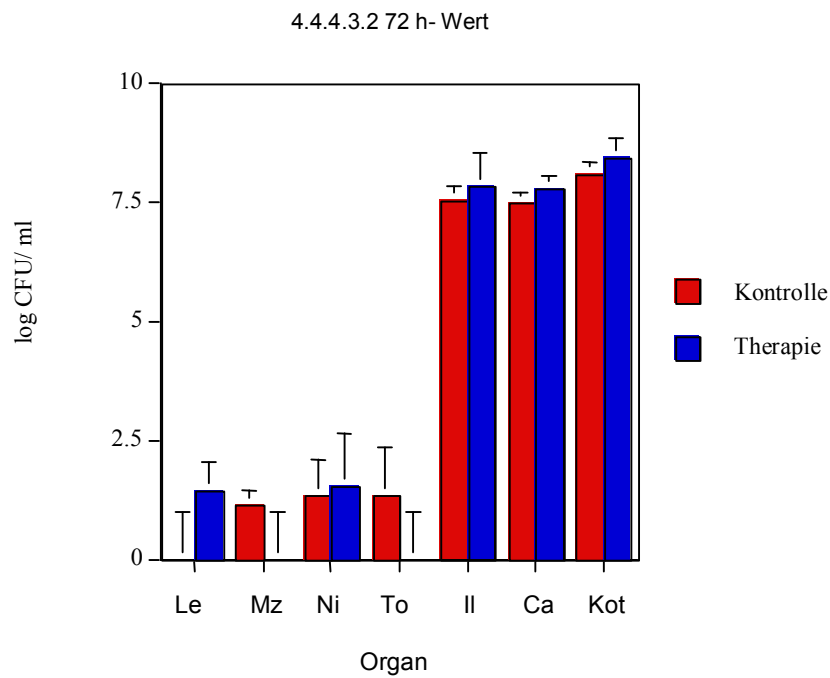
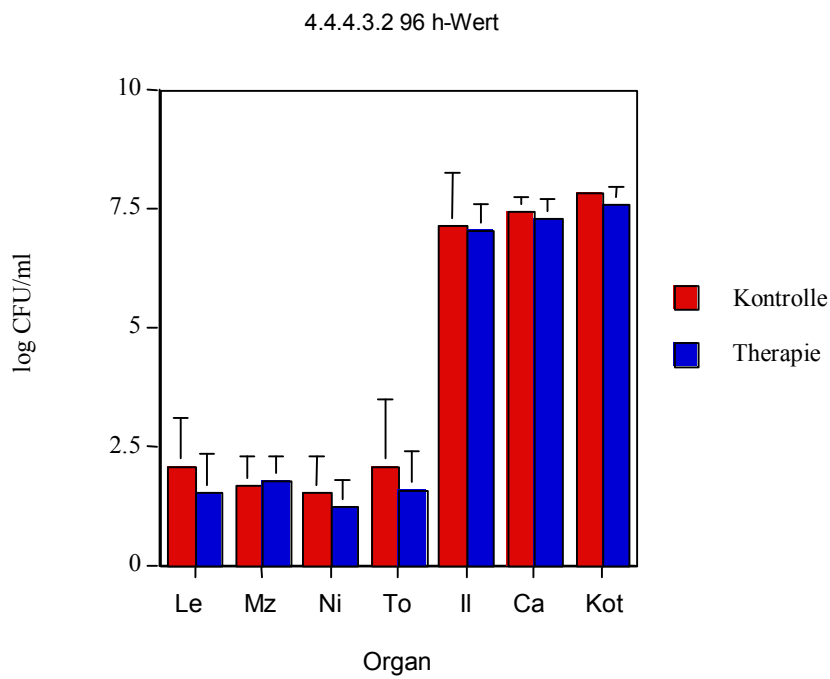


Abbildung 30 mehrfache orale Phagengabe

c)

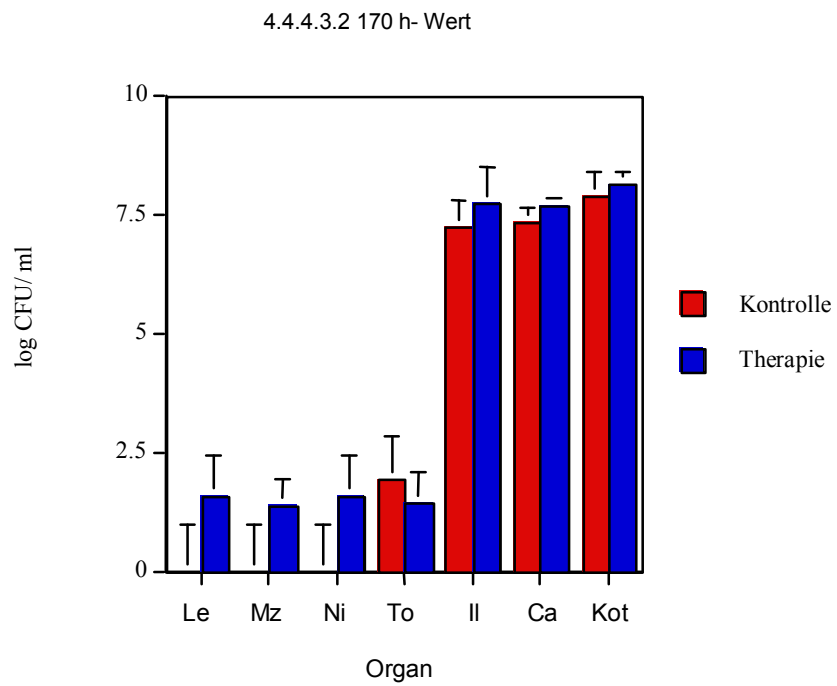


d)



Fortsetzung Abbildung 30 mehrfache orale Phagengabe

e)



Fortsetzung Abbildung 30 mehrfache orale Phagengabe, als Nachweisgrenze wurden 10 CFU/ml angenommen
 untersuchte Organe: Leber (Le), Milz (Mz), Niere (Ni), Tonsillen (To), Ileum (Il), Caecum (Ca), Kot

5 Diskussion

Die weltweite Lage der Resistenzeigenschaften hat sich in den letzten 10 Jahren deutlich verschlechtert. Es traten neue Resistenzen gegen in der Erregerbekämpfung angewendete Antibiotika auf, z.B. gegen Glykopeptide, Chinolone oder Carbapeneme (WITTE u. KLARE, 1999). Zum einen liegt dies begründet im genetischen Potential der Bakterien zur Resistenzentwicklung und dem Selektionsdruck durch den therapeutischen und paratherapeutischen Antibiotikaeinsatz, zum anderen ist der Einsatz von Antibiotika in der Tiermast ein nicht zu unterschätzendes Risiko. Wirkstoffe werden hier oftmals aus technischen Gründen für den ganzen Bestand eingesetzt, bzw. wird der ganze Bestand prophylaktisch behandelt. Der Resistenzverschlechterung einen klaren Vorschub leistete der Einsatz von antibakteriellen Wirkstoffen als Leistungsförderer in der Tiermast (WITTE u. KLARE, 1999).

Untersuchungen an *Y. enterocolitica* Serovar O:3, isoliert aus der Maulhöhle von Schlachtschweinen, haben gezeigt, dass sich auch hier die Resistenzlage insbesondere gegenüber Tetracyclinen verschlechtert hat. Dies ist im Zusammenhang damit zu sehen, dass Tetracycline auch in der Tiermast eingesetzt wurden (FUNK *et al.*, 1998). Während des Schlachtvorganges kann der Schlachtkörper einerseits durch das Halbieren, andererseits durch das Entfernen der Tonsillen und der Innereien mit *Y. enterocolitica* O:3 kontaminiert werden (FREDERIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2000a) und somit gelangen die Erreger in die menschliche Nahrungskette und reichern sich an, da sich *Y. enterocolitica* auch bei 4°C vermehren kann.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung und Erprobung alternativer Behandlungswege von Yersiniosen im Schwein, um die Yersinien als Erreger von humanen Enteritiden und ihren Spätfolgen bzw. Komplikationen in Form von reaktiver Arthritis oder Morbus Reiter bereits im Tier auszuschalten.

5.1 Charakterisierung des Enterocoliticens

Die Produktion von Bacteriocinen wird in vielen, wenn nicht beinahe sogar allen Bakterienarten, beschrieben. So fand bereits Hamon 1964 (HOLLAND, 1967) in 27 Fällen bacteriocinproduzierende Stämme bei verschiedenen Bakteriengattungen. Insbesondere in der Gattung der *Enterobacteriaceae* sind viele verschiedene Bacteriocine zu finden, die unterschiedlichen Bacteriocinklassen angehören. In der Regel sind diese Bacteriocine

Proteine, die plasmidkodiert sind. Als bestuntersuchtestes Beispiel können hier die verschiedenen Colicine aus *E. coli* angeführt werden. Auch der Gattung *Yersinia* können verschiedene Bacteriocinproduzenten zugeschrieben werden: So fanden CALVO *et al.* (1986) Bacteriocine in *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii* und in *Y. intermedia*, wobei schon BOTTONE *et al.* (1979) die Produktion von Bacteriocinen in *Y. intermedia* beschrieben, ebenso wie ein Bacteriocin aus *Y. pseudotuberculosis* (BOTTONE, 1987). NICOLLE *et al.* (1967) stellten ein phagenähnliches, partikuläres Bacteriocin aus einem *Y. enterocolitica*-Stamm dar, das sie elektronenmikroskopisch untersuchten und an dem sie morphologische Studien durchführten. CAFFERKEY *et al.* (1989) fanden 3 Stämme aus klinischen Isolaten von *Y. enterocolitica*, die Bacteriocine bei Raumtemperatur produzierten (CAFFERKEY, 1989). TOORA *et al.* (1989) isolierten aus Büffelmilch *Y. enterocolitica*-Stämme, die ein Bacteriocin produzierten. Als frühestes Beispiel kann *Y. pestis* angeführt werden, aus der BEN-GURION (1958) ein Bacteriocin isolieren konnte. Somit ist die Bacteriocinproduktion auch in der Gattung *Yersinia* durchaus üblich. Auch das Auftreten von partikulären Bacteriocinen ist in dieser Gattung nicht unüblich.

Die am besten untersuchten Bacteriocine sind die Colicine: Colicine sind kleine, plasmidkodierte Proteine, die sich durch herkömmliche Proteinreinigungsverfahren leicht aufreinigen lassen. Demzufolge wurden zunächst Reinigungsverfahren für das Enterocoliticin getestet, die den klassischen Grundzügen der Proteinreinigung folgen. So reinigten HERSCHMAN u. HELINSKI (1967) die beiden Proteine Colicin E2 und E3 durch Salzextraktion, Ammoniumsulfatfällung und Ionenaustauschchromatographie. Sie erhielten 2 Proteine mit einem Molekulargewicht von 60 kDa, die sich durch ihre Wirkungsmechanismen voneinander unterscheiden. Auch das Bacteriocin aus *Y. kristensenii* konnte durch Ammoniumsulfatfällung und anschließende Gelfiltration gereinigt werden (TOORA, 1995).

In Analogie dazu wurde zunächst versucht, das Enterocoliticin mit Ammoniumsulfat zu fällen, wobei es dann nicht mehr möglich war, das gefällte Protein zu lösen. Das abzentrifugierte Pellet ließ sich nicht ohne erheblichen Aktivitätsverlust nur unvollständig in Lösung zu bringen. Anschließend wurde versucht, das Enterocoliticin an einen Ionenaustauscher zu binden. Jedoch im Gegensatz zu den geladenen Proteinen war das Enterocoliticin nicht ausreichend an Ionenaustauscherharze anzulagern. Die Gelchromatographie konnte dazu genutzt werden, um verunreinigende Proteine zu entfernen, da das Enterocoliticin bereits im Ausschlußvolumen von der Säule gewaschen wurde und die Fraktionen der verunreinigenden Proteine erst später von der Säule gewaschen wurden.

Erfolgreich angewendet werden konnte schließlich das Sedimentationsverfahren in der Ultrazentrifuge mit nachfolgendem Reinigungsschritt über eine CsCl-Dichtegradientenzentrifugation analog zur Phagenpräparation. In einem anschließenden Gelfiltrationsschritt wurde bestätigt, dass die Enterocoliticinaktivität in Fraktionen eluiert wurde, in denen Proteine mit einem hohen Molekulargewicht auftraten. Durch die Auftrennung in der SDS-PAGE wurden mehrere Proteinbanden gefunden, die durch die Probenaufbereitung entstanden. Hierbei wurde das Enterocoliticin durch das Aufkochen im SDS-Probenpuffer in seine einzelnen Proteinkomponenten zerlegt, so dass das Muster von mehreren Banden in der SDS-PAGE gefunden wurde. Diese einzelnen Proteine zeigten ein charakteristisches Bandenmuster, das distinkt in den einzelnen Präparationen zu finden war. Der Verdau mit Proteinase K zeigte, dass es sich bei dem Enterocoliticin um einen Partikel mit hohem Proteinanteil handelt, dessen für die Aktivität verantwortlichen Anteile bei einem Proteinaseverdau zerstört werden. Dies entspricht den Ergebnissen von GÖBEL u. BARRY, (1956).

Ebenso wie bei den meisten der entdeckten Bacteriocine bei *Yersinia* fand die Synthese nur bei Raumtemperatur statt, bei 37 °C wurde kein Bacteriocin gebildet. (CAFFERKEY, 1989). Aktivität hingegen zeigte das Enterocoliticin sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 37 °C, dies entspricht ebenfalls den Eigenschaften der anderen bekannten Bacteriocine.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der aufgereinigten Fraktionen zeigte eine phagenschwanzähnliche Struktur, die in Größe und Durchmesser anderen partikulären Bacteriocinen in etwa entspricht. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über bisher untersuchte partikuläre Bacteriocine und ihre Abmessungen, im Vergleich dazu ein T4-Phagenschwanz aus *E. coli* (Tab. 15).

Es existieren vergleichende Studien von Cloacin und dem Phagen aus *Enterococcus cloacae* (DAW u. FALKINER, 1993) bzw. von Pyocin R2 und dem Phagen PS 17 aus *Ps. aeruginosa* (SHINOMIYA *et al.*, 1989), anhand derer die Aussage getroffen wurde: „Bacteriocine scheinen kopflose Phagen zu sein“. Weitere Untersuchungen an den R2 und F2-Pyocinen zeigten, dass diese Pyocine und die sehr nahe verwandten P2- bzw. λ-Phagen aus gemeinsamen Vorfahren entstammen. Im Laufe der Evolution haben sich die phagenschwanzförmigen Pyocine jedoch zu spezialisierten Bacteriocinen entwickelt (NAKAYAMA *et al.*, 2000). Somit sind die Pyocine nicht als simple defekte Phagen anzusehen.

Das von NICOLLE u. HAMMON (1967) entdeckte Bacteriocin scheint dem hier untersuchten Bacteriocin in Größe und Eigenschaft sehr ähnlich zu sein, obwohl sich die Maße etwas unterscheiden. Das im Institut Pasteur untersuchte Bacteriocin wurde allerdings nur in seiner Morphologie charakterisiert, weitere Untersuchungen wurden nicht vorgenommen.

Tabelle 15 Größenvergleich verschiedener Bacteriocine und einem T4-Phagenschwanz

Spezies: Bacteriocin (Phage): Referenz:	Schwanzhülle (sheath) Länge x Durchmesser		Injektionsrohr (core) Länge x Durchmesser
	relaxiert	kontrahiert	
<i>Y. enterocolitica</i> Enterocoliticin (Robert Koch-Inst., 2000)	80 x 15 nm	35 x 20 nm	80 x 5 nm
Bacteriocin aus <i>Y. enterocolitica</i> (HAMON, NICOLLE, 1966/67)	80 x (*) nm	40 x 23 nm	80 x 6 nm
<i>Ps. aeruginosa</i> Pyocin (GOVAN, 1974)	100 x 15 nm	45 x 17 nm	100 x 7 nm
<i>Xenorhabdus nema-</i> <i>tophilus</i> Xenorhabdicin (THALER, 1995)	170 x 20 nm	60 x 25 nm	145 x 8 nm
<i>Erwinia carotovora</i> Carotovoricin (NGUYEN, 1999)	184 x 22 nm	69 x 25 nm	174 x 11 nm
<i>Proteus vulgaris</i> Proteocin (COETZEE, 1968)	128 x 18 nm	56 x 20 nm	128 x 7 nm
<i>E. coli</i> T4-Phage (Schwanz)	113 x 22 nm	52 x 30 nm	113 x 9 nm

(*): keine Angabe

Die nicht kontrahierten Partikel setzen sich sehr schnell mit ihrer Basalplatte an den sensitiven Stamm *Y. enterocolitica* 13169, wobei die ganze Bakterienoberfläche bedeckt erscheint. Nach der Adsorption kontrahieren die Partikel und die Bakterienzelle wird durch Bildung von Kaliumionen-durchlässigen Kanälen zerstört (SCHAUDINN, 2001). Damit entspricht das Enterocoliticin sowohl in seiner Gestalt und Größe als auch in seiner Funktionsweise dem Pyocin R. Typisch für die Bacteriocine aus *Yersinia* scheint zu sein, dass sie nur bei Temperaturen deutlich unter 37 °C gebildet werden, bei Höchsttemperaturen um 25 °C. Wirksam hingegen sind sie sowohl bei 22 °C als auch bei 37 °C. Diese

Eigenschaft zeigt sowohl das Enterocolitacin als auch die Bacteriocine aus *Y. intermedia* (BOTTONE *et al.*, 1979), *Y. frederiksenii* und *Y. kristensenii* (CALVO *et al.*, 1986).

Bacteriocine werden spät nach der Synthese aus der Bakterienzelle exportiert, zuvor sammeln sie sich im Cytoplasma an. Dieser Charakteristik schließt sich auch das Enterocolitacin an, denn einem Anstieg der intrazellulären Aktivität schließt sich zeitverzögert (um ca. 1 Stunde) ein Anstieg der extrazellulären Aktivität an.

Das Wirkungsspektrum des Enterocolitacins beschränkt sich ausschließlich auf Bakterien der Gattung *Yersinia*, und zwar vorwiegend die pathogenen Stämme der Spezies *Y. enterocolitica*. Biovar 1A-Stämme werden selten lysiert. Hiermit entspricht das Enterocolitacin der Definition, die Bacteriocine als Stoffe ausweist, die ein ausgesprochen enges Wirtsspektrum besitzen.

Pyocine sind chromosomal kodiert (SANO *et al.*, 1990), über Pyocine liegen detaillierte Untersuchungen vor (KAGEYAMA *et al.*, 1979; SANO *et al.*, 1990, 1993). Im Gegensatz zu den R-Typ Pyocinen, die einzelsträngige DNA enthalten (LEE *et al.*, 1999), enthielt das Enterocolitacin keinerlei DNA. Sano klonierte die Pyocingene auf Plasmide und zeigte die Proteine, für die sie kodieren, ebenso wurden die entsprechenden Genabschnitte sequenziert und Sequenzanalysen vorgenommen. Es wurde aufgrund der Strukturähnlichkeit vermutet, dass das Enterocolitacin ebenfalls chromosomal kodiert ist. Im Gegensatz zu den R-Pyocinen enthält das Enterocolitacin keine DNA, wie durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion nachgewiesen wurde. Pyocine dagegen enthalten z.T. einzelsträngige DNA (LEE *et al.*, 1999).

Es wurde eine Cosmidgenbank von *Y. enterocolitica* 29930 angelegt. Jeder Phage enthält ein eingebautes DNA-Fragment aus der Gesamt-DNA, die zusammen genommen das vollständige Genom von *Y. enterocolitica* 29930 repräsentieren. Je größer die Fragmente sind, die in den Klonierungsvektor eingebaut werden können, desto kleiner wird die Anzahl der benötigten Klone, um statistisch die Gesamt-Genomgröße von *Y. enterocolitica* abzudecken. Die Größe der Inserts betrug 30 - 40 kbp.

Die Cosmide vermehren sich in den Bakterienzellen wie normale Plasmide, die cos-site aus dem λ -Phagengenom dient als DNA-Verpackungssignal. Sie eignen sich für die Verpackung von sehr langen DNA-Fragmenten (30 - 42 kb), dieser Abstand der beiden cos-sites erlaubt eine Verpackung in die Proteinhülle des Phagen Lambda, zusätzlich tragen die Cosmide zwei Antibiotikaresistenzgene, die zur Selektion genutzt werden können. Kürzere DNA-

Fragmente werden nicht verpackt. Es wurden 400 Klone gepickt, um eine statistisch auswertbare Anzahl an Kolonien untersuchen zu können.

Versuche, den Genabschnitt auf dem Chromosom von *Y. enterocolitica* zu lokalisieren wurden durchgeführt, indem drei Hauptproteinbanden im SDS-Gel ausgewählt wurden, die am stärksten hervortraten und durch einen Westernblot auf eine Nylonmembran übertragen wurden. Diese drei Banden wurden durch einen Edman-Abbau ansequenziert, anschließend wurde die Aminosäuresequenz durch eine Codon-Usage-Tabelle in eine Nukleinsäureabfolge übersetzt. Jedoch waren in der Aminosäuresequenz sehr viele Wobble-Basen enthalten, so dass die daraus abgeleiteten Oligonukleotidsonden nicht spezifisch genug für die Hybridisierungsversuche wurden. Dadurch waren die positiven Hybridisierungsergebnisse nicht reproduzierbar und bei stringenter gewählten Bedingungen blieben die positiven Signale ganz aus. Es zeigte sich also, dass der gesuchte Abschnitt auf dem Chromosom mit den ausgewählten Sequenzen und den daraus abgeleiteten Sonden nicht zu detektieren war. Es müssen weitere, spezifischere tryptische Fragmente der Proteine ausgewählt werden und diese mittels Edman-Abbau sequenziert werden, um die Anzahl der Wobble-Positionen zu vermindern und so besser passende Oligonukleotidsonden zu generieren.

Die Ähnlichkeit des phagenschwanzähnlichen Bacteriocins mit anderen, im Labor isolierten *Yersinia*-Umweltphagen (POPP, 1997) sollte nun genutzt werden, um die entsprechenden Genbereiche im Chromosom von *Y. enterocolitica*, die für Phagenstrukturen kodieren, zu lokalisieren. Hier konnten nun wesentlich stringenter Bedingungen als bei den Hybridisierungsversuchen mit den generierten Oligonukleotiden angewendet werden. Mit der Phagen-DNA als Sonde wurde nun folgender Weg eingeschlagen:

Ziel dieser Strategie war es, wenigstens ein Strukturgen des Enterocoliticins als phagenspezifische Sequenz zu finden. Die Bacteriocingene liegen in der Regel als Gencluster, bestehend aus dem Strukturgen, dem Immunitätsgen, sowie den Genen für den Freisetzungsmechanismus und die Regulation, vor. Wenn man folglich eines dieser Gene gefunden hat, liegen die anderen stromauf oder stromabwärts in unmittelbarer Nähe (RILEY u. GORDON, 1999). Die in Pools zu jeweils 10 Klonen zusammengefaßten Klone zeigten zum Teil positive Signale bei der Hybridisierung gegen eine PY 96 Phagensonde. Nach Vereinzelung der Pools und erneuter Hybridisierung wurden einzelne Klone ausgewählt und diese ansequenziert. Jedoch konnte unter den entsprechenden Klonen keiner gefunden werden, der für eine phagenspezifische Sequenz kodiert.

Es ist im Verlauf dieser Arbeit nicht gelungen, den entsprechenden Abschnitt auf dem Genom von *Y. enterocolitica* zu lokalisieren. Im kürzlich veröffentlichten Genom von *Y. pestis* fanden sich zwei hintereinander liegende Gene, die Genprodukte mit einer hohen Ähnlichkeit (>90 %) in den N-terminalen Aminosäuresequenzen zu den ansequenzierten Enterocoliticin-Proteinen aufweisen. Es ist also zu vermuten, dass diese Gene Verwandtschaft zu den Enterocoliticin-Genen aufweisen. Es werden weitere Arbeiten in der Arbeitsgruppe zur Verifizierung dieser Vermutung durchgeführt.

5.2 Charakterisierung des Phagen PY 100

T4-ähnliche Phagen besitzen kontraktile Schwänze. Die Phagenköpfe haben eine Größe von 1000 Angström (= 100 nm), die Schwänze sind ebenso lang. Kleinere Phagen dieses Typs haben Köpfe mit einem Durchmesser von 800 Angström und ebenfalls Schwänze von 1000 Angström Länge (BRADLEY, 1967). In relaxiertem Zustand zeigt der Schwanz eine Querstreifung, im kontrahierten Zustand eine Längsstreifung. Mit ihren Fibern heften sich die Phagen an die Bakterienzelle an und der Kontraktionsmechanismus wird ausgelöst (BRADLEY, 1970). Der *Yersinia*-Phage PY 100 weist sehr große Strukturähnlichkeiten mit dem T4-Coliphagen auf. Bemerkenswert erscheint das breite Wirtsspektrum, das der Phage aufweist, indem eine speziesübergreifende lytische Wirkung auf verschiedene *Y. pseudotuberculosis*-Stämme festgestellt wurde. Im Gegensatz dazu fanden NILEHN u. ERICSON (1969) Phagen aus *Y. enterocolitica*, die weder gegen *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* noch gegen andere Bakterien aktiv waren. Es sind nach zahlreichen Reinigungsschritten nach wie vor Plaques in unterschiedlichen Größen anzutreffen, was sehr untypisch für einen Phagen ist, denn die Plauegröße ist eine charakteristische Eigenschaft für den jeweiligen Phagen. Durch den Vergleich von drei Verdauungsmustern aus der DNA, extrahiert aus den Plaques der verschiedenen Größe, ließ sich jedoch eindeutig belegen, dass es sich um einen einzigen Phagen handelt.

Da der Phage aus Schweinegülle isoliert wurde, kann geschlossen werden, dass der Schweinebestand mit Yersinien infiziert war. Denn nur dort, wo sich der Wirt aufhält, ist der Phage vermehrungsfähig. Dies bestätigt, dass Schweinebestände als potentielle Gefahren- und Ursachenquelle für die Yersiniose des Menschen gelten müssen. Ort der Kontamination von Lebensmitteln ist vermutlich außerdem der Schlachthof bzw. der Schlachtvorgang, wie aus zahlreichen Veröffentlichungen hervorgeht. Da die Schweine nicht offensichtlich erkranken, bleibt die Kontaminationsgefahr ohne weitere Diagnostik unerkannt.

Das Schwein gilt als Hauptreservoir für humanpathogene Yersinen. Untersuchungen an Schlachtschweinen in Kanada haben gezeigt, dass bei Schweinen in sehr hohen Prozentzahlen in Rachen- und Zungenabstrichen sowie in den Tonsillen hohe *Y. enterocolitica* O:3-Titer gefunden werden, zugleich ist die Inzidenz humaner Yersiniosen, verursacht durch das Serovar O:3 in dieser Provinz Kanadas signifikant erhöht. In den anderen kanadischen Provinzen wurde so gut wie keine Serovar O:3-Stämme in Schlachtschweinen nachgewiesen, dort geht die Inzidenz der durch das Serovar O:3 verursachten Yersiniosen gegen Null (SCHIEMANN *et al.*, 1981). Ähnliches wurde von PEDERSEN (1979) in Dänemark festgestellt, er isolierte die pathogenen Serovare O:3 und O:9 nur dort, wo auch für Humaninfektionen eine Inzidenz zu finden war. Zu gleichen Ergebnissen führten Untersuchungen in Finnland. Dort wurde nachgewiesen, dass Schweineinnereien, einschließlich Zunge, Herz, Leber, Niere und Tonsillen hoch kontaminiert waren mit *Y. enterocolitica* O:3 (FREDERIKSSON-AHOMAA *et al.*, 1999, 2000a + b). Weiterhin kam man auch hier zum Schluß, dass kontaminiertes Schweinefleisch der wichtigste Überträger von *Y. enterocolitica* O:3 vom Schlachthaus auf den Menschen ist (FREDERIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2001). Bei Untersuchungen von Schlachtschweinen in Süddeutschland wurden in 60% der Tonsillen *Y. enterocolitica* Serovar O:3 gefunden. Ausgehend von den Tonsillen werden beim weiteren Schlachtvorgang die übrigen Teile des Geschlinges sowie der Schlachtkörper mit *Y. enterocolitica* kontaminiert (FREDERIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2001). Auch NIELSEN *et al.* fanden, dass 70 – 80 % aller schlachtreifen Schweine in Dänemark mit *Y. enterocolitica* O:3 infiziert und seropositiv sind. Somit kann es auf diesem Weg zur Infektion des Menschen beim Verzehr von Rohfleischprodukten kommen (NIELSEN u. WEGENER, 1996).

Hiermit ist der Infektionsweg vom Schwein zum Menschen sehr wahrscheinlich (KAPPERUD, 1991) und die Suche nach Methoden, diese Infektionsgefahr einzudämmen, sehr notwendig. Am sinnvollsten erscheint es, den Weg der selektiven Erregerbekämpfung zu wählen, um spezielle Erregerbekämpfung zu betreiben. Zum einen wird so die Bildung von Resistenzen bei anderen Bakterienspezies verhindert, zum anderen sind die Mehrzahl der Bakterien, die im Darm von Mensch und Tier leben, nützliche Kommensalen. Diese würden aber im Falle einer breit wirkenden Medikation mit abgetötet werden.

5.3 Therapieversuche

Die Funktionsweise von Bakteriophagen und Bacteriocinen scheint auf cytoplasmatischer Ebene sehr ähnlich zu sein. Die Bakteriophageninfektion geht einher mit einer

Permeabilitätsänderung in der Cytoplasmamembran. Der Phage trägt ein Protein-Strukturelement, das einen Kanal durch eine Membran formen kann, oder in der Lage ist, die Bildung eines solchen Kanals zu veranlassen. Es wurden mehrere Phagenproteine gefunden, die für die Bildung solcher Kanäle verantwortlich sind (ALATOSSAVA, 1994).

Bacteriocine, die ebenfalls Poren in Membranen formen, können in zwei Gruppen unterteilt werden:

Die erste Gruppe kann Poren in die Zellwand formen. Hierzu zählen die Breitspektrum-Bacteriocine der grampositiven Bakterien, wie zum Beispiel die Lantibiotika oder die Bacteriocine der Milchsäurebakterien (DYKES, 1995).

Die zweite Gruppe benötigt keine Membranproteine, um Poren zu formen. Diese Eigenschaft besitzen Bacteriocine mit einem engen Wirtsspektrum, die Spezifität beruht auf der Anwesenheit eines Rezeptorproteins auf der Cytoplasmamembran. Auch die Immunitätsproteine interagieren mit der Cytoplasmamembran, kodiert wird dieses Protein durch das Bacteriocinoperon. Diese Proteine wirken, indem sie das Rezeptorprotein blockieren, oder die Porenbildung in der Cytoplasmamembran verhindern. Dies stellt wiederum eine Analogie zum Imm-Protein des T4-Phagen von *E. coli* dar (LU u. HENNING, 1989). Gemeinsam ist den Phagen und Bacteriocinen, dass das modulierende Genom der Phagen und das Operon der Bacteriocine mit dem bakteriellen Genom ko-existieren. Defekte Bakteriophagen, wie das Enterocolitacin, nehmen eine Zwischenstellung zwischen Phagen und Bacteriocinen ein (GARRO u. MARMUR, 1970).

Genutzt werden sollte in dieser Arbeit diese spezifische Wirkungsweise, die sowohl das Enterocolitacin als auch der Phage PY 100 auf sensitive *Yersinia*-Stämme besitzen. Diese Eigenschaft zeigte sowohl das Enterocolitacin als auch der Phage PY 100 bei in vitro-Versuchen, die zum einen auf ein Zellkultursystem und zum anderen auf das Maus-Modell übertragen werden sollten.

5.3.1 Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurde die humane Epithelzelllinie HEp-2 benutzt, um den Einfluß des Enterocolitacins auf adhärierte und invadierte *Y. enterocolitica* 13169 zu untersuchen. Es wird beschrieben, dass pathogene *Y. enterocolitica* O:3-Stämme in der Lage sind, an eukaryonte Zellen zu adhären und bei 37 °C einen cytotoxischen Effekt (Zellabrundung) auszuüben. Dieser Effekt ist abhängig von der Gegenwart des Virulenzplasmides (VESIKARI *et al.*, 1983). Der chromosomale Abschnitt, der zur Adhäsion und Invasion von *Y.*

enterocolitica befähigt, liegt in den Loci *inv* und *ail*. Diese beiden Gene sind direkt oder indirekt an der Invasion beteiligt. (MILLER u. FALKOW, 1988). Pathogene *Yersinia enterocolitica*-Stämme sind in der Lage, an epitheliale Zelllinien (HeLa-Zellen oder HEp-2-Zellen) zu adhären und bei 37 °C auch in die Zellen zu invadieren, was ihnen bei Raumtemperatur nicht möglich ist (UNE, 1977 a + b; LEE *et al.*, 1977). Bei Raumtemperatur sind alle O:3-, O:9- und O:8-Stämme in der Lage, an Zellen zu adhären, unabhängig davon, ob sie in Besitz eines Virulenzplasmides sind oder nicht.

5.3.1.1 Zellkulturversuche mit Enterocoliticin

In den Zellkulturversuchen zeigte sich deutlich, dass sich adhären Yersinien durch das Enterocoliticin abtöten lassen, in eukaryonte Zellen eingewanderte Bakterien können hingegen nicht erreicht werden. Das Enterocoliticin ist somit nicht in der Lage, in eukaryonte Zellen einzuwandern, da hierfür offensichtlich keine Rezeptoren vorhanden sind. Doch auch bei Aufnahme des Enterocoliticins in die Zelle wären die Yersinien nicht angreifbar, denn sie werden in Vesikel verpackt (UNE, 1977). Somit sind sie vor Angriffen geschützt und der Körper muß Abwehrkräfte mobilisieren, wie er sie normalerweise gegen intrazelluläre Erreger mobilisieren muß (AUTENRIETH *et al.*, 1996).

Entsprechend den vorangegangenen Versuchen zur MHK-Bestimmung des Enterocoliticins (SCHAUDINN, 2001) wurden im Zellmodell Enterocoliticinkonzentrationen von $1,3 \times 10^5$ AU/ml und $1,3 \times 10^4$ AU/ml eingesetzt. Die Ergebnisse im Adhäsionsversuch ermutigten, den Therapieversuch im Mausmodell durchzuführen. Zwar waren die Abtötungsraten in der Zellkultur durch das Antibiotikum Gentamicin höher, doch hier ist die selektive Abtötung eines bestimmten Keimes nicht möglich. Es würde die gesamte Gentamicin-empfindliche Darmflora abgetötet werden, und genau hier liegt der Vorteil des Enterocoliticins: die selektive Eliminierung spezifischer pathogener Keime.

5.3.1.2 Zellkulturversuche mit PY 100

Invasions-und Adhäsionsversuche wurden auch mit dem Phagen PY 100 nach der gleichen Vorgabe wie bei *Y. enterocolitica* 13169 durchgeführt. Da der Phage eventuell unspezifisch an die eukaryonten Zellen gebunden hat, blieben die Invasionsversuche ohne Erfolg. Es konnte keinerlei Effekt auf in die Zellen eingewanderte Bakterien festgestellt werden. Adhäsionsversuche waren nicht möglich, da der Phage bei Raumtemperatur keine Plaques bildet. Diesem Ergebnis entsprechen die von Kawaoka, der feststellte, dass bei 25 °C

wesentlich mehr Rezeptoren für Phagen ausgebildet werden als bei 37 °C (KAWAOKA *et al.*, 1982 a+b). Hier bleibt es noch, festzustellen, warum der Bakteriophage keinen Effekt in der Zellkultur auslösen kann und an welchen der Faktoren er eventuell adhäriert. Möglicherweise ist das Zellkulturmedium wenig geeignet zur Phageninfektion, da die Yersinien kaum darin wachsen.

Doch die übrigen in-vitro-Tests ermutigten auch hier zur Erprobung des Phagen im Tierversuch, da es sich um einen virulenten Phagen handelt, und die Voraussetzung zur erfolgreichen Anwendung von Phagen in der Therapie gegeben ist (KUTTER, 1997). Zur Therapie eignen sich nur virulente Phagen, da sich diese im lytischen Zyklus befinden und somit sofort Bakterien infizieren und nach Vermehrung lysieren können. Lysogene Phagen hingegen eignen sich nicht, da sie in der Regel zunächst als Prophage ins Bakteriengenom eingebaut werden.

5.3.2 Tierversuch

Humanpathogene *Y. enterocolitica* können unterteilt werden in mausvirulente Stämme (Amerikanische Stämme, Serovar O:8) und in nicht-mausvirulente Stämme (Europäische Stämme Serovar O:3, O:9, O:5,27). Die Mausvirulenz ist chromosomal kodiert, da bei Übertragung des Virulenzplasmids von einem mauspathogenen Stamm auf einen nicht-mauspathogenen Stamm die Mausvirulenz nicht ko-übertragen wird (HEESEMAN *et al.*, 1993). Alle mausvirulenten Serotypen produzieren ein Eisenaufnahmesystem, ein Siderophor. Das Siderophor ist auf einer chromosomalen Pathogenitätsinsel kodiert, es besteht aus einem Siderophor, einem Rezeptorprotein und einem cytoplasmatischen Transportprotein. Siderophore halten nicht nur die Eisenversorgung des Erregers aufrecht, sondern unterdrücken gleichzeitig die Immunantwort des Wirtes (AUTENRIETH, 1996). Auch der hier verwendete *Y. enterocolitica*-Stamm 13169 gehört dem weniger virulenten Serovar O:3 an und ist nicht mauspathogen, er lässt sich allerdings bis zu 35 Tagen sowohl in den Faeces als auch im Darm von Mäusen nachweisen. Ein plasmidloser Stamm wäre bereits nach kurzer Zeit von polymorphkernigen Granulocyten aufgenommen worden und in den Peyer'schen Plaques eliminiert worden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von RUIZ-BRAVO *et al.* (1999) für *Y. enterocolitica* O:9 gezeigt. PEARSON *et al.* (1979) wiesen *Y. enterocolitica* O:3 bis zu 20 Tage im Kot der Mäuse nach. Damit war der Nachweiszeitraum für den entsprechenden Stamm in der vorliegenden Arbeit länger und der *Y. enterocolitica*-Stamm 13169 war für die geplanten Versuche geeignet.

Als Tiermodell wurden sechs Wochen alte, weibliche Mäuse der Linie Balb/C ausgewählt, da sich diese gegenüber einer *Yersinia*-Infektion als empfindlich erwiesen haben (HANCOCK *et al.*, 1986). Auch RUIZ-BRAVO *et al.* (1999) schlagen diesen Mäusestamm als Tiermodell sowohl für die orale Infektion als auch für parenterale Infektion vor.

Kennzeichnend für die Rate der detektierten Yersinien nach der Infektion war, dass schon nach sehr kurzer Zeit in allen Organen Yersinien (nach 6 h) zu finden waren, wobei diese innerhalb von 24 Stunden aus den Organen so gut wie eliminiert waren. In Übereinstimmung damit konnten auch FALCAO *et al.* (1984) ebenfalls nach 6 h Yersinien aus den Organen isolieren. Aufgrund des kurzen Zeitraums bis zur Elimination des Keims aus den Organen kommen keine spezifischen Abwehrmechanismen des Immunsystems in Betracht. Vielmehr kann hier nur die unspezifische Abwehr des Organismus eingegriffen haben. Im Gastrointestinaltrakt und im Kot hingegen waren Bakterientiter über einen langen Zeitraum hinweg zu finden. Es wird in der Literatur ebenfalls beschrieben, dass die Milz von infizierten Mäusen 10 Tage nach der Infektion steril ist, obwohl in den Faeces über einen längeren Zeitraum hinweg noch Yersinien nachgewiesen werden können (RUIZ-BRAVO *et al.*, 2001). Dies erscheint als das typische Bild bei nicht-mausvirulenten, pathogenen *Yersinia*-Stämmen.

5.3.2.1 Therapieversuche mit dem Enterocoliticin

Bisher wurde wenig mit Bacteriocinen als Therapeutikum experimentiert, zu groß ist die Sorge, dass die Proteine, bzw. die proteinähnlichen Komponenten, aus denen sie zusammengesetzt sind, als Antigene wirken und immunologische Reaktionen, insbesondere verursacht durch Toxine, hervorrufen könnten. Mit Verschlechterung der Resistenzlage wird jedoch in neuerer Zeit vermehrt die Forschung in diese Richtung betrieben. Es gibt einige Veröffentlichungen, die einen vielversprechenden Ansatz aufzeigen. So konnte MERRIKIN *et al.* (1972) *Ps. aeruginosa*-Infektionen bei Mäusen mit intravenösen bzw. mit intraperitonealen Gaben von Pyocin heilen, BRAUDE u. SIEMIENSKI (1968) zeigten bei Ratten eine Heilung bei *E. coli*-Infektionen des Urogenitaltrakts durch Colicin.

Nach der Infektion der Tiere per os wurde das Enterocoliticin ebenfalls oral verabreicht, da dies der natürliche Weg der Infektion ist. Der Sitz der Yersinien nach der Infektion ist erwiesenermaßen in den Tonsillen, bzw. bei der Maus im lymphatischen Rachenring, so dass es sinnvoll erscheint, diesen Weg der Gabe des möglichen Therapeutikums zu wählen. Die parenterale Gabe des Enterocoliticins scheint im Gegensatz zur parenteralen Phagengabe schwierig zu sein, da die Tiere dies schlecht verkraften, sie zeigten deutliche

Zeichen von Unverträglichkeitsreaktionen. Es ist anzunehmen, dass sich trotz der zahlreichen Reinigungsschritte in der Präparation noch Partikel befinden, die eine Abwehrreaktion im Tier hervorrufen.

Es ließ sich keine signifikante Verringerung der Keimzahlen weder in den Organen noch in den untersuchten Teilen des Intestinaltraktes feststellen. Der Verlauf der *Yersinia*-Titer in der Kontrollgruppe und den beiden Therapiegruppen unterschied sich nur minimal, so dass nicht von einem therapeutischen Effekt gesprochen werden kann. Kennzeichnend ist auch hier, dass in den Organen bereits nach 24 h eine Abnahme der Keimzahlen in den Organen stattgefunden hat, während im Gastrointestinaltrakt nahezu gleichbleibend hohe Keimzahlen bestehen bleiben.

Es muß eventuell der Zeitpunkt der Enterocoliticingabe verändert werden, so dass das Enterocoliticin vor der Infektion gegeben wird, um eine Prophylaxe zu erreichen. Eine Verbesserung der Wirksamkeit könnte auch erreicht werden, indem das Enterocoliticin z.B. in Dragees, die sich erst im Darm auflösen, verpackt wird. So könnte es seine Wirkung erst im Darm entfalten, um dort am Hauptangriffspunkt der Yersinien ansetzen zu können.

5.3.2.2 Therapieversuche mit dem Phagen PY 100

Die Vorteile der Phagen liegen in ihrer Fähigkeit zur Replikation in den Zielbakterien, so dass eine einmalige Dosis ausreichend sein könnte. Die Nebenwirkungen sind minimal und Phagen gelten als nicht toxisch. Diese Eigenschaften zeigte auch PY 100 im Tierrmodell. Es ließ sich in allen Organen schon nach kurzer Zeit der Phage nachweisen, bevor er allmählich über das lymphoreticuläre System wieder ausgeschieden wurde, auch war kein toxischer Effekt bei den Tieren zu beobachten, so dass man von einer guten Verträglichkeit für die Tiere ausgehen kann. In Tierversuchen waren die Phagen sogar einigen Antibiotika bei systemischen Infektionen in der Wirkung überlegen (BARROW u. SOOTHILL, 1997). Die Keimzahlen waren mit dieser Art der Therapie jedoch nicht signifikant abzusenken. Hierbei liegt die Schwierigkeit im Nachweissystem: es ist wesentlich einfacher einen Effekt bei Infektionen darzustellen, die ansonsten für das Tier tödlich verlaufen würden, als wenn der Versuch nach Anstieg bzw. Abfall der Keimzahl bewertet werden muß. Auch eine Abschätzliste, wie stark die Tiere leiden, ist nicht praktikabel, da bei diesen Versuchen die Mäuse so gut wie keine klinischen Symptome zeigten.

Entscheidend kann auch der Zeitpunkt der Phagengabe sein, wie Bingel (KIESEWALTER, 1966) bei Therapieversuchen der Ruhr mit Vibriophagen feststellte. Hier erwies es sich als

sehr wichtig, ob die Phagen vor den Ruhrbakterien den Darm erreichten oder nicht. Dies ist insbesondere bei Toxinbildern zu beachten, da sonst eine massive Toxinausschüttung droht, wenn die Phagen nach den Bakterien den Darm erreichen. Die prophylaktische Phagengabe wurde in der vorliegenden Arbeit nicht erörtert, da die Situation in den Schweinebetrieben eine andere ist und man durchseuchte Betriebe sanieren möchte. Daher müssen zunächst Versuche durchgeführt werden, ob die Yersinien, die das Tier bereits infiziert haben, erreicht werden können und somit die Phagen als Therapeutikum einsetzen zu können.

Weiterhin stellt der Einsatz von Phagen, die auf eine lange Verweildauer im Organismus selektioniert wurden eine wichtige Alternative dar. Diese Phagen werden weniger schnell über das lymphoreticuläre System eliminiert und können so länger im Organismus Wirksamkeit gegen die entsprechenden pathogenen Keime zeigen (MERRIL *et al.*, 1996).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich das Enterocolicin zwar ausgesprochen vielversprechend im Zellkulturversuch gezeigt hat, es den Erwartungen im Tiermodell selbst jedoch nicht standhalten konnte. Auch das äußerst potente Verhalten des Phagen PY 100 *in vitro* konnte die Erwartungen im Tierversuch nicht erfüllen. Dennoch erscheint mir dies als der richtige Weg auf der Suche nach Alternativmöglichkeiten zur Antibiotikatherapie. Es gibt im Reich der Bakterien noch eine Vielzahl von noch nicht entdeckten Wirkstoffen der gleichen oder ähnlichen Klasse; dass diese zum Teil hochpotente Wirkungen haben, wurde in verschiedenen Tiermodellen hinreichend beschrieben. Hier wird ersichtlich, dass die Erprobung solcher Wirkstoffe auch tatsächlich am Tiermodell erfolgen muß, da man nicht in jedem Falle von einem ausgezeichnet wirksamen Zellkulturversuch auf die Wirksamkeit im Organismus rückschließen kann. Dennoch sollte man sich bemühen, die Tierzahlen für solche Versuche auf ein absolutes Minimum zu reduzieren.

6 Zusammenfassung

Isolierung und Charakterisierung eines phagenähnlichen Bacteriocins und eines virulenten Phagen und deren therapeutische Einsatzmöglichkeiten gegen *Yersinia enterocolitica*-Infektionen

Heike Kaspar

Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Robert Koch-Institut, Berlin

November 2003

122 Seiten, 31 Abbildungen, 15 Tabellen, 160 Literaturangaben, 1 Anhang

Durch die wachsende Anzahl von multiresistenten Bakterien, die auch durch den Mißbrauch von Antibiotika als Masthilfsmittel in der Tierzucht entstanden sind, erlangen alternative Methoden zur Bekämpfung bakterieller Infektionen ihre Bedeutung zurück. Diese Arbeit befaßt sich mit zwei Substanzen, um Infektionen mit *Yersinia* (*Y.*) *enterocolitica* einzudämmen.

Es wurde in dieser Arbeit ein Bacteriocin aus *Y. enterocolitica* isoliert und charakterisiert. Das Reinigungsschema folgte den Strategien der Phagenaufreinigung, angeschlossen wurde zur Überprüfung der Reinheit ein Gelfiltrationsschritt. Die Eigenschaften des gereinigten Enterocoliticins wurden in vitro und in vivo getestet. Im Zellkulturversuch zeigte sich das Enterocoliticin in der Abtötung von an eukaryonte Zellen adhärierten Bakterien als sehr wirksam, in eukaryonte Zellen eingewanderte Bakterien wurden hingegen nicht abgetötet. Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse wurde der Therapieansatz im Mausmodell angewendet. Das Mausmodell ist für *Y. enterocolitica* ein bereits erprobtes Modell. Die Tiere wurden oral infiziert, um den natürlichen Infektionsweg nachzustellen, das Enterocoliticin wurde ebenfalls oral verabreicht. Die Infektion wurde durch die Enterocoliticingabe nur unwesentlich beeinflusst, auch gelang der Nachweis des Enterocoliticins weder im Gastrointestinaltrakt noch in den Faeces. Die Therapie der infizierten Mäuse gelang auf diese Weise nicht.

Weiterhin wurde ein *Yersinia*-Phage aus Schweinegülle isoliert, gereinigt und charakterisiert. Es handelt sich um einen T4-ähnlichen, virulenten Phagen mit einer Genomgröße von ca. 50 kbp und einem weiten Wirtsspektrum in *Yersinia*, das sogar spezieübergreifend ist. Da der Phage bei 37°C die Wirtszelle lysiert und durch seine hohe Wirksamkeit in vitro erschien der Phage von seinen Eigenschaften her zur Phagentherapie als geeignet. Es wurden analog

zum Enterocoliticin-Tierexperiment Mäuse mit *Y. enterocolitica* oral infiziert, diesen Tieren wurde der Phage auf unterschiedlichen Wegen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten appliziert. Die Tiere zeigten bei der parenteralen Gabe keinerlei Unverträglichkeitserscheinungen, bei der oralen Gabe wurde der Magensaft zuvor abgepuffert. Der Therapieerfolg im Vergleich zur Kontrollgruppe war wenig vielversprechend, es zeigten sich sehr ähnliche Infektionsverläufe in Kontroll- und Therapiegruppe.

Diese beiden untersuchten Alternativwege zur Behandlung von Yersiniosen erwiesen sich bei den angewendeten Methoden bislang als nicht erfolgreich, dennoch muß auf diesem Gebiet weitergeforscht werden, wie erfolgreiche Therapieansätze aus anderen Tiermodellen zeigen. Es wirken nur wenige Phagen im Organismus als Therapeutikum, dennoch müssen diese Untersuchungen unternommen werden, um im Organismus wirksame, antibakterielle Substanzen zu finden und um einen Alternativweg zur Antibiotikumtherapie zu entwickeln.

7 Summary

Isolation and characterisation of a phagetail-like bacteriocin and of a virulent phage and their possibilities of therapy against *Yersinia enterocolitica*-infections

Heike Kaspar

Institute of Bacteriology and Mycology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig,
Robert Koch-Institute, Berlin

November 2003

122 pages, 31 figures, 15 tabels, 160 references, 1 appendix

The increasing number of multi-resistant bacteria, which resulted also from the abuse of antibiotics as mast additives in animal breeding, alternative methods regain importance for the combat at bacterial infections back. In this work two substances were investigated to restrict infections with *Yersinia (Y.) enterocolitica*.

In this study a bacteriocin from *Y. enterocolitica*, designated enterocoliticin, was isolated and characterized. The purification strategy followed protocols of phage isolation. The purified preparations were examined by final gel filtration step. The properties of the purified enterocoliticin were tested in vitro and in vivo. In a cell culture assay enterocoliticin was able to kill bacteria adherent to eukaryontic cells very effectively, however, bacteria invaded into eukaryotic cells were not affected. Due to these results enterocoliticin was applied in a mouse-infection-model in a therapeutic attempt. The mouse infection model is a well established system for infections with *Y. enterocolitica*. The animals were orally infected with *Yersinia*, and the enterocoliticin was orally applied, too. The infection was only insignificantly influenced by enterocoliticin. In addition of enterocoliticin was not detected succeeded in the gastro-intestinal-tract or in the faeces. The therapy of the infected mice did not succeed in this way.

Furthermore, a *Yersinia* phage from pig manure was isolated and characterized. It is a T4 phage like virulent phage, containing a genom of approx. 50 kbp and posessing a wide host-range in *Yersinia*. Because of lytic properties of the phage at 37°C and his high effectiveness in vitro the phage appeared to be for phage therapy experiments. Similarly to the enterocoliticin experiment mice were infected with *Y. enterocolitica* orally, these animals were treated with the phage on different application routes and different time points. The

animals did not show any incompatibilities upon parenteral gift. Before oral administration of the phage the gastric juice was buffered. Therapy outcome in comparison to the control group was little promising, it revealed a very similar infection process in control group and therapy group.

These two investigated alternative ways for the control of *Yersinia* infections did not prove successful with the applied methods, however, further research must be carried out as successful therapeutical experiments from other animal models showed. It has to be considered that not all phages are appropriate as therapeutical agent however, more studies must be conducted to find more appropriate substances, which may work as effective antibacterial substances to develop alternative ways to antibiotic therapy.

8 Literaturverzeichnis

- ADAMS, M.H. (1959). Bacteriophages. Wiley Interscience Publications, New York
- ACKERMANN, H.W. u. M. DUBOW (1987). Practical applications of bacteriophages. Viruses of prokaryotes I: General Properties of Bacteriophages. CRC Press, Boca Raton Florida.
- ALATOSSAVA, T. (1994). Analogies between superinfection exclusion and bacteriocin immunity. Trends Microbiol. 2, 215-216.
- ALEKSIC, S., J. BOCKEMÜHL u. F. LANGE (1986). Studies on the serology of flagellar antigens of *Yersinia enterocolitica* and related *Yersinia* species. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.[A.] 261, 299-310.
- ALEKSIC, S. u. J. BOCKEMÜHL (1990). Microbiology and epidemiology of *Yersinia* infections. Immun. Infekt. 18, 178-185.
- ALEKSIC, S. u. J. BOCKEMÜHL (1984). Proposed revision of the Wauters et al. antigenic scheme for serotyping of *Yersinia enterocolitica*. J. Clin. Microbiol. 20, 843-845.
- ALISKY, J., K. ICZKOWSKI, A. RAPOPORT u. N. TROITSKY (1998). Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. J. Infect. 36, 5-15.
- AUTENRIETH, I.B. u. V. KEMPE (1996). Defense Mechanisms in Peyer's Patches and Mesenteric Lymph Nodes against *Yersinia enterocolitica* Involve Integrins and Cytokines. Infect. Immun., 1357-1368.
- AUTENRIETH, I.B. (1996). Zur Immunbiologie der experimentellen Yersiniose. Mikrobiologie, 6, 127-131.
- BARROW, P.A. u. J.S. SOOTHILL (1997). Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. Trends Microbiol. 5, 268-271.
- BEN-GURION, R. (1958). Bacteriocin-like Material Produced by *Pasteurella pestis*. J. Gen. Microbiol. 19, 289-297.
- BENKERROUM, N., Y. GHOUATI, W.E. Sandine u. A. TANTAOUI-ELARAKI (1993). Methods to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins. Lett. Appl. Microbiol. 17, 78-81.
- BERCHIERI, A.Jr, M.A. LOVELL u. P.A. BARROW (1991). The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium*. Res. Microbiol. 142, 541-549.
- BERCOVIER, H., H.H. MOLLARET, N.R. KRIEG u. J.M. HOLT (1984). Family I. Enterobacteriaceae Genus XIV *Yersinia*. Bergey's manual of systematic bacteriology. 15, 498-506

- BISWAS, B., S. ADHYA, P. WASHART, B. PAUL, A.N. TROSTEL, B. POWELL, R. CARLTON u. C.R. MERRIL (2002). Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect. Immun.* 70, 204-210.
- BLISKA, J.B., J.E. GALAN u. S. FALKOW (1993). Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell* 73, 903-920.
- BOTTONE, E.J., K.K. SANDHU u. M.A. PISANO (1979). *Yersinia intermedia*: temperature-dependent bacteriocin production. *J. Clin. Microbiol* 10, 433-436.
- BOTTONE, E.J. (1997). *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 257-276.
- BOTTONE, E.J. (1977). *Yersinia enterocolitica*. A panoramic view of a charismatic microorganism. *Crit. Rev. Microbiol.* 5, 211-241.
- BOTTONE, E.J. (1987). Bacteriocin in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Contr. Microbiol. Immunol.* 9, 56.
- BRADLEY, D.E. (1967). Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* 31, 230-314.
- BRADLEY, D.E. (1970). A comparative study of some properties of the phi-X174 type bacteriophages. *Can. J. Microbiol* 16, 965-971.
- BRAUDE, A.I. u. J.S. SIEMIENSKI (1968). The influence of bacteriocins on resistance to infection by gramnegative bacteria. II. Colicin action, transfer of colicinogeny, and transfer of antibiotic resistance in urinary infections. *J. Clin. Invest.* 47, 1763-1773.
- BRYNOGHE, R. u. J. MAISIN (1921). Essais de therapeutique au moyen du bacteriophage du *Staphylocoque*. *C. R. Soc. Biol.* 85, 1120-1121.
- CAFFERKEY, M.T., K. McCLEAN u. M.E. DRUMM (1989). Production of bacteriocin-like antagonism by clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* 27, 677-680.
- CALVO, C., J. BRAULT, A. RAMOS-CORMENZANA u. H.H. MOLLARET (1986). Production of bacteriocin-like substances by *Yersinia frederiksenii*, *Y. kristensenii*, and *Y. intermedia* strains. *Folia Microbiol. (Praha.)* 31, 177-186.
- CALVO, C., J. BRAULT, M.A. CHALVIGNAC, A. RAMOS-CORMENZANA u. H.H. MOLLARET (1986). Ability of *Yersinia enterocolitica* cells to inactivate bacteriophage I at 25 degrees and 37 degrees C. *Microbios* 46, 137-141.
- CARTER, P.B. (1975). Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* for mice. *Infect. Immun.* 11, 164-170

- COETZEE, H.L., H.C. De KLERK, J.N. COETZEE u. J.A. SMITH (1968). Bacteriophage-tail-like particles associated with intra-species killing of *Proteus vulgaris*. J.Gen.Virol. 2[1], 29-36.
- CORNELIS, G.R. (1994). *Yersinia* pathogenicity factors. Curr. Top. Microbiol Immunol. 192, 243-263.
- d'HERELLE, F. (1917) Sur un microbe invisible antagoniste des bac. dysenteriques. Cr. r. Acad. Sci., Paris 165, 373.
- DAVIES, E.A., H.E. BEVIES u. I. DELVES-BROUGHTON (1997). The use of the bacteriocin nisin as a preservative in ricotta type cheeses to control food-borne pathogenes. Lett. Appl. Microbiol. (5), 343-346.
- DAW, M.A. u. F.R. FALKINER (1993) The ultrastructure of cloacin C5 of *Enterobacter cloacae*. Proceedings of the Royal Microscopical society. 28, (Supplement 1), 24.
- DAW, M.A. u. F.R. FALKINER (1996). Bacteriocins: nature, function and structure. Micron. 27, 467-479.
- DELVES-BROUGHTON, J. (1990). Nisin and its use as a food preservative. Food Technol. 40, 102.
- DUBOS, R.J. u. J.H. STRAUSS (1943). The multiplication of bacteriophage in vivo and its protective effect against an experimental infection with *Shigella dysenteriae*. J. exp. Med. 78, 161-168.
- DYKES, G.A. (1995). Bacteriocins: ecological and evolutionary significance. Trends Ecol.Evol. 10, 186-189.
- EBERLE, U. (2002). Heiler aus der Jauchgrube. Bild der Wissenschaft 4, 20-25.
- FALCAO, D.P., M.T. SHIMIZU u. L.R. TRABULSI (1984). Kinetics of infection induced by *Yersinia*. Curr. Microbiol. 11, 303-308.
- FALKINER, F.R. u. C.T. KEANE (1977). Epidemiological information from active and passive pyocine typing of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Med. Microbiol. 10, 447-459.
- FÄLLMAN, M., C. PERSSON u. H. WOLF-WATZ (1997). *Yersinia* proteins that target host cell signaling pathways. J. Clin. Invest. 99, 1153-1157.
- FRAMPTON, E.W. u. M. MANDEL (1970). Properties of the deoxyribonucleic acid contained in the defective particle coliphage 15. J. Virol. 5, 8-13.
- FREDERIKSSON-AHOMAA, M., T. KORTE u. H. KORKEALA (2000a) Contamination of carcasses, offals, and the environment with yadA-positive *Yersinia enterocolitica* in a pig slaughterhouse. J Food Prot. 63, 31-35.

FREDERIKSSON-AHOMAA, M., M. BUCHER, C. HANK, A. STOLLE u. H. KORKEALA (2001). High prevalence of *Yersinia enterocolitica* 4:O3 on pig offal in southern Germany: a slaughtering technique problem. Syst. Appl. Microbiol. 24, 457-463.

FREDERIKSSON-AHOMAA, M., S. HIELM u. H. KORKEALA (1999). High prevalence of yadA-positive *Yersinia enterocolitica* in pig tongues and minced meat at the retail level in Finland. J. Food. Prot. 62, 123-127.

FREDERIKSSON-AHOMAA, M., J. BJÖRKROTH, S. HIELM u. H. KORKEALA (2000b). Prevalence and characterisation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pig tonsils from different slaughterhouses. Food. Microbiol. 17, 93-101.

FREDERIQ, P. (1957). Colicins. Ann. Rev. Microbiol. 11, 7-21

FUNK, J.A., H.F. TROUTT, R.E. ISAACSON u. C.P. FOSSLER (1998). Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in groups of swine at slaughter. J. Food. Prot. 61, 677-682.

GARRO, A.J. u. J. MARMUR (1970). Defective bacteriophages. J. Cell Physiol. 76[3], 253-263.

GEWINNER, C. (1997). Molekularbiologische Untersuchungen zur Charakterisierung von Plasmiden aus verschiedenen *Yersinia*-Stämmen. Diplomarbeit an der Freien Universität Berlin, Fachbereich Biologie

Göbel, W. F., G.G. Barry u. T. Shedlovsky (1956). The production of colicin K in media maintained a constant pH. J. Exp. Med. 103, 577.

GOVAN, J.R. (1974). Studies on the pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*: production of contractile and flexuous pyocins in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Microbiol. 80, 17-30.

GOVAN, J.R. (1986). In vivo significance of bacteriocins and bacteriocin receptors. Scand. J. Infect. Dis. 49, 31-37.

GRATIA, A. (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souche de colibacille. C. R. Soc. Bol. 93, 1040-1041.

GRÜTZKAU, A., C. HANSKI, H. HAHN u. E.O. RIECKEN (1990). Involvement of M-cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. Gut 31, 1011-1015.

HAAS, H., T. SACKS u. N. SALTZ (1974). Protective effect of pyocin against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice. J. Infect. Dis. 129, 470-472.

HAMON, Y., P. NICOLLE, J.F. VIEU u. H. MOLLARET (1966). Recherche de la bacteriocinogenie parmi les souches de *Yersinia enterocolitica*. Annales de l'institut pasteur 111, 368-372.

- HANCOCK, G.E., R.W. SCHAEDELER u. T.T. MACDONALD (1986). *Yersinia enterocolitica* infection in resistant and susceptible strains of mice. *Infect. Immun.* 53, 26-31.
- HAVARSTEIN, L.S., H. HOLO u. I.F. NES (1994). The leader peptide of colicin V shares consensus sequence with leader peptides that are common among peptide bacteriocin produced by gram positive bacteria. *Microbiology*, 140, 2383-2389
- HEESEMAN, J. u. L. GRÜTER (1987). Genetic evidence that the outer membrane protein YOP1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells. *FEMS Microbiol. lett.* 40, 37-41.
- HEESEMAN, J. u. K. GAEDE (1993). Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in rodents: a model for human yersiniosis. *APMIS* 101, 417-429.
- HEESEMAN, J. u. H. BRANDIS (2001). Die Gattung *Yersinia*, Yersiniosen. In: Brandis, H., Eggers, H.J., Köhler, W., Pulverer, G. (Hrsg), *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*, 8. Aufl., Gustav Fischer Verlag, 315-330.
- HERSCHMANN, H.R. u. D.R. HELINSKI (1967). Purification and characterization of colicin E2 and colicin E3. *J. Biol. Chem.* 242, 5360-5368.
- HIGUCHI, K. u. J.L. SMITH (1961). Studies on the nutrition and physiology of *Pasteurella pestis*. *J. Bacteriol.* 81, 605-608.
- HOLLAND, I.B. (1967). Bacteriocins. *Antibiotics Vol. 1* (ed. Gottlieb, D., Shaw, P.D.), Springer, Berlin-Heidelberg-New York.
- HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A., J. DE KONING u. J. HEESEMAN (1988). Persistence of *Yersinia enterocolitica* in man. *Infection* 16, 81-85.
- HOWELL, T.H., J.P. FIORELLINI, P. BLACKBURN, S.J. PROJAN, J. DE LA HARPE u. R.C. WILLIAMS (1993). The effect of a mouthrinse based on nisin, a bacteriocin, on developing plaque and gingivitis in beagle dogs. *J. Clin. Periodontol.* 20, 335-339.
- HUANG, W. u. J. MARMUR (1970). Characterization of inducible bacteriophages in *Bacillus licheniformis*. *J. Virol.* 5, 237-246.
- IJIMA, T. (1962). Studies on the colicinogenic factor in *Escherichia coli* K12. Induction of colicin production by mitomycin C. *Biken J.* 5, 1-8.
- ISBERG, R.R. u. S. FALKOW (1985). A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12. *Nature* 317, 262-264.
- ISHII, S.I., Y. NISHI u. F. EGAMI (1965). The fine structure of a pyocin. *J. Mol. Biol.* 13, 428-431.

- ITO, S. u. M. KAGEYAMA (1970). Relationship between pyocins and a bacteriophage in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Appl. Microbiol. 16, 231-240.
- ITO, S., M. KAGEYAMA u. F. EGAMI (1970). Isolation and characterisation of pyocins from several strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Appl. Microbiol. 16, 205-214.
- JACOBS, J., D. JAMAER, J. VANDEVEN, M. WOUTERS, C. VERMYLEN u. J. VANDEPITTE (1989). *Yersinia enterocolitica* in donor blood: a case report and review. J. Clin. Microbiol. 27, 1119-1121.
- JAMES, R., C. LAZDUNSKI u. F. PATTUS (1991). Bacteriocins, microcins, and lantibiotics. Springer Verlag, New York 519.
- KAGEYAMA, M., S. MITSUBASHI u. P. HASHIMOTO (1975). Bacteriocins and bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbial Drug Resistance. University of Tokyo Press 291-305.
- KAGEYAMA, M., T. SHINOMIYA, Y. AIHARA u. M. KOBAYASHI (1979). Characterization of a bacteriophage related to R-type pyocins. J. Virol. 32, 951-957.
- KAPPERUD, G. (1991). *Yersinia enterocolitica* in food hygiene. Int. J. Food. Microbiol. 12, 53-65.
- KAWAOKA, Y., K. OTSUKI u. M. TSUBOKURA (1982a). Characteristics of *Yersinia enterocolitica* bacteriophages. Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. 253, 102-109
- KAWAOKA, Y., K. OTSUKI u. M. TSUBOKURA (1982b). Temperature-dependent variation in the synthesis of the receptor for *Yersinia enterocolitica* bacteriophage XI. Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. 253, 364-369
- KIESEWALTER, J. (1966). Untersuchungen über die Verwendbarkeit von Phagen zur Prophylaxe der Ruhr. Ann. Imm. Hung. 9, 87-95.
- KLAUS, S., D.H. KRÜGER u. J. MEYER (1992). Bakterienviren, Gustav Fischer Verlag.
- KUTTER, E. (1997). Phage therapy: Bacteriophages as antibiotics. www.evergreen.edu , 1-17.
- LEDERBERG, J. (1996). Smaller fleas ... ad infinitum: therapeutic bacteriophage redux. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 3167-3168.
- LEE, F.K., K.C. DUDAS, J.A. HANSON, M.B. NELSON, P.T. LOVERDE u. M.A. APICELLA (1999). The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is a bacteriophage tail-like particle that contains single-stranded DNA. Infect. Immun. 67, 717-725.
- LEE, W.H., P.P. McGRATH, P.H. CARTER u. E.L. EIDE (1977). The ability of some *Yersinia enterocolitica* strains to invade HeLa cells. Can. J. Microbiol. 23, 1714-1722.

- LIAN, C.J., W.S. HWANG u. C.H. PAI (1987a). Plasmid-mediated resistance to phagocytosis in *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 55, 1176-1183.
- LIAN, C.J., W.S. HWANG, J.K. KELLY u. C.H. PAI (1987b). Invasiveness of *Yersinia enterocolitica* lacking the virulence plasmid: an in-vivo study. *J. Med. Microbiol.* 24, 219-226.
- LU, M.J. u. U. HENNING (1989). The immunity (imm) gene of *Escherichia coli* bacteriophage T4. *J. Virol.* 63, 3472-3478.
- MERRIKIN, D.J. u. C.S. TERRY (1972). Use of pyocin 78-C2 in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *Appl. Microbiol.* 23, 164-165.
- MERRIL, C.R., B. BISWAS, R. CARLTON, N.C. JENSEN, G.J. CREED, S. ZULLO u. S. ADHYA (1996). Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 3188-3192.
- MILLER, V.L. u. S. FALKOW (1988). Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect. Immun.* 56, 1242-1248.
- MILLER, V.L., J.J. FARMER, W.E. HILL u. S. FALKOW (1989). The ail locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. *Infect. Immun.* 57, 121-131.
- NAKAYAMA, K., K. TAKASHIMA, H. ISHIHARA, T. SHINOMIYA, M. KAGEYAMA, S. KANAYA, .M. OHNISHI, T. MURATA, H. MORI u. T. HAYASHI (2000). The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. *Mol. Microbiol.*;38, 213-231.
- NATTERMANN, H. u. J. DEDEK (1986). Serologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* beim Schwarzwild. *Mh. Vet.-Med.* 41, 565-567.
- NATTERMANN, H. u. F. HORSCH (1994). Neue Erkenntnisse zur *Yersinia enterocolitica*-Infektion des Schweines. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft. Jahrestagung, Schloß Rauischholzhausen, 251-259
- NGUYEN, A.H., T. TOMITA, M. HIROTA, T. SATO u. Y. KAMIO (1999). A simple purification method and morphology and component analyses for carotovoricin Er, a phage-tail-like bacteriocin from the plant pathogen *Erwinia carotovora* Er. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 1360-1369.
- NICOLLE, P., H. MOLLARET, Y. HAMON, J.F. VIEU, J. BRAULT u. G. BRAULT (1967). Lysogenic, bacteriocinogenic and phage-typing study of species *Yersinia enterocolitica*. *Ann. Inst. Pasteur* 112, 86-92.
- NIELSEN, B. u. H.C. WEGENER (1996). Public health and pork and pork product: regional perspectives of Denmark. *Rev. Sci. Tech.* 16, 513-524.

- NILEHN, B. u. C. ERICSON (1969). Studies on *Yersinia enterocolitica*. Bacteriophages liberated from chloroform treated cultures. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 75, 177-187.
- O'BRIEN, G.J. u. H.K. MAHANTY (1994). Colicin 24, a new plasmid-borne colicin from a uropathogenic strain of *Escherichia coli*. Plasmid 31, 288-296.
- PAERREGAARD, A., F. ESPERSEN u. M. SKURNIK (1991). Adhesion of yersiniae to rabbit intestinal constituents: role of outer membrane protein YadA and modulation by intestinal mucus. Contrib. Microbiol. Immunol. 12, 171-175.
- PEARSON, A.D., I.D. RICCIARDI, D.H. WRIGHT u. W.G. SUCKLING (1979). An experimental study of the pathology and ecology of *Yersinia enterocolitica* infection in mice. Contr. Microbiol. Immunol. 5, 335-345.
- PEDERSEN, K.B., P.B. CARTER, L. LAFLEUR, S. TOONA u. S. KARGER (1979). Occurrence of *Yersinia enterocolitica* in the throat of swine. *Yersinia enterocolitica* biology, epidemiology, and pathology. Contributions to microbiology and immunology. Vol 5, 253-256.
- PEPE, J.C., M.R. WACHTEL, E. WAGAR u. V.L. MILLER (1995). Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. Infect. Immun. 63, 4837-4848.
- PFANNKUCH, E. u. G.A. KAUSCHE (1940). Isolierung und Übermikroskopische Abbildung eines Bakteriophagen. Naturwissenschaften 28, 46.
- POPP, A. (1997). Charakterisierung von temperenten Phagen von Bakterien der Gattung *Yersinia* und deren mögliche Bedeutung für einen Gentransfer. Diplomarbeit an der Universität Bayreuth, Fachbereich Biologie
- PORTNOY, D.A. u. S. FALKOW (1981). Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*. J. Bacteriol. 148, 877-883.
- PUGSLEY, A.P., B. OUDEGA u. K.G. HARDY (1987). Methods for studying colicins and their plasmids. Plasmids. IRL Press, Oxford. 105-161.
- REYNAUD, A., L. CLOASTRE, J. BERNARD, H. LAVERAN, H.W. ACKERMANN, D. LICOIS u. B. JOLY (1992). Characteristics and diffusion in the rabbit of a phage for *Escherichia coli* 0103. Attempts to use this phage for therapy. Vet. Microbiol. 30, 203-212.
- RILEY, M.A. (1998). Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. Annu. Rev. Genet. 32, 255-278.
- RILEY, M.A. u. D.M. GORDON (1999). The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. Trends Microbiol. 7, 129-133.
- RKI. (1999). Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten. Epidemiol. Bull. 8

- ROBINS-BROWNE, R.M. u. J.K. PRPIC (1985). Effects of iron and desferrioxamine on infections with *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun. 47, 774-779.
- ROBINS-BROWNE, R.M., S. TZIPARI, G. GONIS, J. HAYES, M. WHITERS u. J.K. PRPIC (1985). The pathogenesis of *Yersinia enterocolitica* infection in gnotobiotic piglets. J. Med. Microbiol. 19, 297-308
- RUIZ-BRAVO, A., E. MORENO u. M. JIMENEZ-VALERA (2001). Intestinal infection of BALB/c mice with *Yersinia enterocolitica* O:9 causes major modifications in phenotype and functions of spleen cells. Microbiology 147, 3165-3169.
- RUIZ-BRAVO, A., E. MORENO, A. SAMPEDRO u. M. JIMENEZ-VALERA (1999). Experimental infection of mice with *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 by oral and parenteral routes: spreading and enterotropism of virulent yersiniae. Curr. Microbiol. 38, 257-263.
- RUSKA, H. (1940). Über die Sichtbarmachung der Bakteriophagenlyse im Übermikroskop. Naturwissenschaften 28, 45-46.
- SAHL, H.G. u. BRANDIS, H. (1994). Bacteriocine. Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie, 7. Auflage, Gustav Fischer Verlag 119-122.
- SAMBROOK, J.E., E.F. FRITSCH u. T. MANIATIS (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2 nd.ed. New York Cold Spring Harbour Laboratory
- SANO, Y., H. MATSUI, M. KOBAYASHI u. M. KAGEYAMA (1993). Molecular structures and functions of pyocins S1 and S2 in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 175, 2907-2916.
- SANO, Y., H. MATSUI, M. KOBAYASHI, M. KAGEYAMA, S. SILVER, A.M. CHAKRABARTY, B. IGLEWSKI u. S. KAPLAN (1990). Pyocin S1 and S2, bacteriocins of *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Pseudomonas*: biotransformations, pathogenesis, and evolving biotechnology. ASM Press, Washington 352-358.
- SCHAUDINN, C. (2001). Bacteriocin aus *Yersinia enterocolitica*. Diplomarbeit an der Universität Braunschweig, Fachbereich Biotechnologie
- SCHIEHMANN, D.A. u. C.A. FLEMING (1981). *Yersinia enterocolitica* isolated from throats of swine in eastern and western Canada. Can. J. Microbiol. 27, 1326-1333.
- SCHLESINGER, M. (1933). Reindarstellung eines Bakteriophagen in mit freiem Auge sichtbaren Mengen. Biochem. Zschr. 264, 6.

- SEAMAN, E., E. TARMY u. J. MARMUR (1964). Inducible phage of *Bacillus subtilis*. *Biochem.* 3, 607-613.
- SEEBACHER, C., E. HILLMANN, I. DIESTERWEG u. J. KIESEWALTER (1982). *Yersinia enterocolitica* as cause of various dermatoses with special reference to erythema nodosum. *Dermatol. Monatsschr.* 168, 789-796.
- SHINOMIYA, T. u. S. INA (1989). Genetic comparison of bacteriophage PS17 and *Pseudomonas aeruginosa* R- type pyocin. *J. Bacteriol.* 171, 2287-2292.
- SLOPEK, S., B. WEBER-DABROWSKA, M. DABROWSKI u. A. KUCHAROWICZ-KRUKOWSKA (1987a). Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 35, 569-583.
- SLOPEK, S. u. A. KUCHAROWICZ-KRUKOWSKA (1987b). Immunogenic effect of bacteriophage in patients subjected to phage therapy. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 35, 553-561.
- SMITH, H.W. u. HUGGINS, M.B. (1977). Treatment of experimental *Escherichia coli* infection in mice with colicine V. *J. Med. Microbiol.* 10, 479-482.
- SMITH, H.W. u. HUGGINS, M.B. (1982). Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *J. Gen. Microbiol.* 128, 307-318.
- SMITH, H.W. u. HUGGINS, M.B. (1983). Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *J. Gen. Microbiol.* 129, 2659-2675.
- SMITH, H.W., HUGGINS, M.B. u. K.M. SHAW (1987). The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. *J. Gen. Microbiol.* 133, 1111-1126.
- SMITH, H.W., HUGGINS, M.B. u. K.M. SHAW (1987). Factors influencing the survival and multiplication of bacteriophages in calves and in their environment. *J. Gen. Microbiol.* 133, 1127-1135.
- SOOTHILL, J.S. (1992). Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *J. Med. Microbiol.* 37, 258-261.
- SOOTHILL, J.S. (1994). Bacteriophage prevents destruction of skin grafts by *Pseudomonas aeruginosa*. *Burns.* 20, 209-211.
- STEVENS, K.A., B.W. SHELDON, N.A. KLAPES u. T.R. KLAENHAMER (1991). Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gramnegative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3613-3615.

- STRALEY, S.C. u. R.D. PERRY (1995). Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in *Yersinia*. Trends. Microbiol. 3, 310-317.
- STRASSER DE-SAAD, M.A. u. M.C. HANEA DE-NADRA (1993). Characterisation of bacteriocin produced by *Pediococcus sacceus* from wine. J. Appl. Bacteriol. 74, 406-410.
- SUMMERS, W.C. (2001). Bacteriophage therapy. Ann. Rev. Microbiol. 55, 437-451.
- TAGG, J.R., A.S. DAJANI u. L.W. WANNAMAKER (1976). Bacteriocins of grampositive bacteria. Bacteriol. Rev. 40, 722-756.
- THALER, J.O., S. BAGHDIGUIAN u. N. BOEMARE (1995). Purification and characterization of xenorhabdycin, a phage tail-like bacteriocin, from the lysogenic strain F1 of *Xenorhabdus nematophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 61, 2049-2052.
- TOORA, S., A.S. BALA, R.P. TIWARI u. G. SINGH (1989). Production of bacteriocin by isolates of *Yersinia enterocolitica* from fresh buffalo milk. Folia Microbiol. (Praha.) 34, 151-156.
- TOORA, S. (1995). Partial purification and characterization of bacteriocin from *Yersinia kristensenii*. J. Appl. Bacteriol. 78, 224-228.
- TOPLEY, W.W.C. u. J. WILSON (1925). Further observations on the role of the Twort-d'Herelle phenomenon in the epidemic spread of mouse-typhoid. J. Hyg. 24, 295-300.
- TWORT, F.W. (1915). An investigation on the nature of ultramicroscope viruses. Lancet II, 1241.
- UNE, T. (1977a). Studies on the pathogenicity of *Yersinia enterocolitica*. II. Interaction with cultured cells in vitro. Microbiol. Immunol. 21, 365-377.
- UNE, T. (1977b). Studies on the pathogenicity of *Yersinia enterocolitica*. I. Experimental infection in rabbits. Microbiol. Immunol. 21, 341-363.
- URATANI, Y. u. T. HOSHINO (1984). Pyocin R1 inhibits active transport in *Pseudomonas aeruginosa* and depolarizes membrane potential. J. Bacteriol. 157, 632-636.
- VESIKARI, T., C. SUNDQVIST u. M. MAKI (1983). Adherence and toxicity of *Yersinia enterocolitica* 0:3 and 0:9 containing virulence-associated plasmids for various cultured cells. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand [B.] 91, 121-127.
- WARTENBERG, K., W. KNAPP, N.M. AHAMED, C. WIDEMANN u. H. MAYER (1983). Temperature-dependent changes in the sugar and fatty acid composition of lipopolysaccharides from *Yersinia enterocolitica* strains. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. 253, 523-530.

WAUTERS, G., K. KANDOLO u. M. JANSSENS (1987). Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. Contrib. Microbiol. Immunol. 9, 14-21.

WAUTERS, G. (1979). Carriage of *Yersinia enterocolitica* serotype 3 by pigs as a source of human infection. Contrib. Microbiol. Immunol. 5, 249-252.

WEBER-DABROWSKA, B., M. ZIMECKI u. M. MULCZYK (2000). Effective phage therapy is associated with normalization of cytokine production by blood cell cultures. Arch. Immunol. Ther. Exp.;48, 31-37.

WEBER-DABROWSKA, B., M. DABROWSKI u. S. SLOPEK (1987). Studies on bacteriophage penetration in patients subjected to phage therapy. Arch. Immunol. Ther. Exp. 35, 563-568.

WHO (2000). www.who.int/infectious-disease-report/2000

WILLIAMS, R.J. (1976). Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections with pyocines. J. Med. Microbiol. 9, 153-161.

WINNACKER, E.L. (1987). From genes to clones. VCH VerlagsgesellschaftmbH, Weinheim, Germany

WITTE, W. u. I. KLARE (1999). Antibiotika-Resistenz bei bakteriellen Infektionserregern. Bundesgesundheitsblatt 42 , 8-16.

YANG, Y. u. R.R. ISBERG (1993). Cellular internalization in the absence of invasin expression is promoted by the *Yersinia pseudotuberculosis* yadA product. Infect. Immun. 61, 3907-3913.

9 Anhang

9.1 Tabellen

zu 4.4.3 Therapieversuch mit Enterocoliticin, orale Gabe

6h-Wert, Kontrollgruppe

Organ	Tiernummer 1/1	1/2	1/3	1/4	1/5	Mittelwert +/- s
Le	$3,3 \times 10^4$	$4,96 \times 10^4$	$4,1 \times 10^3$	$3,05 \times 10^3$	$6,26 \times 10^4$	$3,05 \times 10^4 \pm 2,6 \times 10^4$
Mz	$4,27 \times 10^4$	$5,4 \times 10^3$	$3,95 \times 10^3$	$5,45 \times 10^3$	$4,67 \times 10^4$	$2,08 \times 10^4 \pm 1,95 \times 10^4$
Ni	$2,94 \times 10^4$	$6,05 \times 10^3$	$4,11 \times 10^4$	$3,99 \times 10^4$	$6,32 \times 10^4$	$3,59 \times 10^4 \pm 2,07 \times 10^4$
To	$3,07 \times 10^4$	$2,42 \times 10^4$	3×10^4	$3,6 \times 10^3$	$7,15 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4 \pm 2,5 \times 10^4$
Il	$7,45 \times 10^5$	$3,87 \times 10^5$	$4,35 \times 10^6$	$4,45 \times 10^5$	$2,54 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6 \pm 1,72 \times 10^6$
Ca	$8,5 \times 10^8$	$4,58 \times 10^8$	$8,74 \times 10^8$	$1,64 \times 10^8$	$2,94 \times 10^8$	$5,28 \times 10^8 \pm 3,2 \times 10^8$
Kot	$1,33 \times 10^9$	$8,34 \times 10^8$	$1,22 \times 10^9$	$5,67 \times 10^8$	$1,01 \times 10^9$	$9,92 \times 10^8 \pm 3,05 \times 10^8$

24 h-Wert, Kontrollgruppe

Organ	Tiernummer 1/6	1/7	1/8	1/9	1/10	Mittelwert +/- s
Le	3×10^2	$1,5 \times 10^2$	$3,3 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$	$1,95 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3 \pm 1,3 \times 10^3$
Mz	2×10^3	$1,5 \times 10^2$	$1,25 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$	$3,3 \times 10^3$	$1,86 \times 10^3 \pm 1,22 \times 10^3$
Ni	$9,5 \times 10^3$	$8,5 \times 10^3$	1×10^2	$4,7 \times 10^3$	$4,85 \times 10^3$	$5,53 \times 10^3 \pm 3,72 \times 10^3$
To	7×10^3	7×10^3	1×10^2	5×10^1	$4,15 \times 10^3$	$3,66 \times 10^3 \pm 3,4 \times 10^3$
Il	$4,1 \times 10^4$	$3,97 \times 10^4$	$2,63 \times 10^4$	$8,4 \times 10^4$	$7,34 \times 10^5$	$1,85 \times 10^5 \pm 3,08 \times 10^5$
Ca	$6,4 \times 10^5$	$1,56 \times 10^7$	$1,78 \times 10^7$	$2,21 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$	$6,93 \times 10^5 \pm 8,95 \times 10^5$
Kot	$6,15 \times 10^5$	$1,47 \times 10^5$	$1,12 \times 10^7$	$1,44 \times 10^5$	$7,7 \times 10^5$	$2,84 \times 10^5 \pm 4,7 \times 10^5$

72h-Wert, Kontrollgruppe

Organ	Tiernummer 1/11	1/12	1/13	1/14	1/15	Mittelwert +/-s
Le	0	0	0	0	0	0
Mz	0	0	0	0	0	0
Ni	0	0	0	0	0	0
To	0	0	0	0	0	0
Il	$2,78 \times 10^4$	$4,95 \times 10^5$	$1,92 \times 10^4$	$1,93 \times 10^4$	$3,6 \times 10^3$	$1,13 \times 10^5 \pm 2,14 \times 10^5$
Ca	$2,15 \times 10^5$	$1,84 \times 10^5$	$4,14 \times 10^4$	$2,44 \times 10^4$	$1,61 \times 10^4$	$9,62 \times 10^4 \pm 9,54 \times 10^4$
Kot	$1,77 \times 10^5$	$2,36 \times 10^5$	$4,65 \times 10^4$	$3,72 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$	$1,06 \times 10^5 \pm 9,43 \times 10^4$

144h-Wert, Kontrollgruppe

Organ	Tiernummer 1/16	1/17	1/18	1/19	1/20	Mittelwert +/-s
Le	0	0	0	0	0	0
Mz	0	0	0	0	0	0
Ni	0	0	0	0	0	0
To	0	0	0	0	0	0
Il	9×10^2	$1,6 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$	$2,27 \times 10^3$	$6,6 \times 10^1$	$1,41 \times 10^3 \pm 9,3 \times 10^2$
Ca	$6,7 \times 10^3$	$6,65 \times 10^4$	$2,34 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$4,67 \times 10^2$	$2,2 \times 10^4 \pm 2,55 \times 10^4$
Kot	$1,36 \times 10^4$	$2,87 \times 10^4$	$2,63 \times 10^4$	$2,49 \times 10^4$	$3,87 \times 10^2$	$4,33 \times 10^4 \pm 1,18 \times 10^4$

zu 4.4.3 Therapieversuch mit Enterocoliticin, orale Gabe

6h-Wert, Therapiegruppe 1

Organ	Tiernummer 2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	Mittelwert +/-s
Le	$4,25 \times 10^4$	$3,54 \times 10^4$	$4,89 \times 10^4$	$2,85 \times 10^4$	$7,3 \times 10^4$	$4,57 \times 10^4 \pm 1,71 \times 10^4$
Mz	$4,72 \times 10^4$	$5,71 \times 10^4$	$5,76 \times 10^4$	$3,05 \times 10^3$	$4,86 \times 10^4$	$4,27 \times 10^4 \pm 2,27 \times 10^4$
Ni	$3,0 \times 10^4$	$5,08 \times 10^4$	$4,72 \times 10^4$	$3,66 \times 10^4$	$3,95 \times 10^4$	$4,08 \times 10^4 \pm 8,3 \times 10^3$
To	$4,66 \times 10^4$	$4,37 \times 10^4$	$4,09 \times 10^4$	$4,07 \times 10^4$	$5,65 \times 10^4$	$4,57 \times 10^4 \pm 6,5 \times 10^3$
Il	$8,04 \times 10^5$	$1,35 \times 10^5$	$6,45 \times 10^5$	$3,69 \times 10^5$	$2,93 \times 10^5$	$2,14 \times 10^5 \pm 3,3 \times 10^5$
Ca	$1,12 \times 10^9$	$9,8 \times 10^8$	$1,56 \times 10^8$	$2,12 \times 10^9$	$2,04 \times 10^9$	$1,28 \times 10^9 \pm 8,16 \times 10^8$
Kot	$1,98 \times 10^9$	$3,06 \times 10^7$	$1,12 \times 10^7$	$1,04 \times 10^9$	$2,04 \times 10^9$	$1,02 \times 10^9 \pm 9,95 \times 10^8$

24 h-Wert, Therapiegruppe 1

Organ	Tiernummer 2/6	2/7	2/8	2/9	2/10	Mittelwert +/-s
Le	3×10^2	3×10^2	3×10^2	$3,45 \times 10^3$	5×10^1	$8,8 \times 10^2 \pm 1,4 \times 10^2$
Mz	$1,45 \times 10^3$	$3,5 \times 10^2$	$3,5 \times 10^2$	1×10^2	$2,5 \times 10^2$	$5 \times 10^2 \pm 5,41 \times 10^2$
Ni	2×10^2	5×10^2	$5,5 \times 10^3$	$3,5 \times 10^2$	4×10^2	$1,4 \times 10^3 \pm 2,3 \times 10^3$
To	$6,5 \times 10^3$	$1,55 \times 10^3$	$2,55 \times 10^3$	$3,5 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$2,22 \times 10^3 \pm 2,58 \times 10^3$
Il	$1,05 \times 10^5$	$5,87 \times 10^4$	$8,6 \times 10^3$	$9,25 \times 10^4$	$4,71 \times 10^5$	$1,47 \times 10^5 \pm 1,85 \times 10^5$
Ca	$1,95 \times 10^6$	$4,8 \times 10^4$	$3,98 \times 10^6$	$5,56 \times 10^6$	$5,73 \times 10^4$	$2,32 \times 10^6 \pm 2,43 \times 10^6$
Kot	$2,09 \times 10^7$	$9,23 \times 10^5$	$3,54 \times 10^6$	$2,15 \times 10^5$	$1,9 \times 10^4$	$5,12 \times 10^6 \pm 8,9 \times 10^{6+}$

72h-Wert, Therapiegruppe 1

Organ	Tiernummer 2/11	2/12	2/13	2/14	2/15	Mittelwert +/-s
Le	0	0	0	0	0	0
Mz	0	0	0	0	0	0
Ni	0	0	0	0	0	0
To	0	0	0	0	0	0
Il	$4,95 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$1,84 \times 10^5$	$7,62 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$	$9,65 \times 10^4 \pm 7,29 \times 10^4$
Ca	$9,3 \times 10^4$	$3,19 \times 10^5$	$1,38 \times 10^5$	$8,39 \times 10^4$	$3,01 \times 10^5$	$1,87 \times 10^5 \pm 1,14 \times 10^5$
Kot	$3,44 \times 10^4$	$5,65 \times 10^5$	2×10^5	$1,81 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5 \pm 2,23 \times 10^5$

144h-Wert, Therapiegruppe 1

Organ	Tiernummer 2/16	2/17	2/18	2/19	2/20	Mittelwert +/-s
Le	0	0	0	0	0	0
Mz	0	0	0	0	0	0
Ni	0	0	0	0	0	0
To	0	0	0	0	0	0
Il	$1,4 \times 10^3$	$2,54 \times 10^5$	$7,9 \times 10^3$	$1,57 \times 10^3$	$3,3 \times 10^1$	$5,3 \times 10^4 \pm 1,12 \times 10^4$
Ca	$1,07 \times 10^5$	$2,78 \times 10^5$	$3,49 \times 10^5$	$5,5 \times 10^3$	$1,85 \times 10^4$	$1,52 \times 10^5 \pm 1,55 \times 10^5$
Kot	$1,13 \times 10^4$	$2,2 \times 10^5$	$3,04 \times 10^5$	$1,09 \times 10^4$	$3,8 \times 10^6$	$8,7 \times 10^5 \pm 1,64 \times 10^4$

Zu 4.4.3 Therapieversuch mit Enterocoliticin, orale Gabe

72h-Wert, Therapiegruppe 2

Organ	Tiernummer 3/1	3/2	3/3	3/4	3/5	Mittelwert +/-s
Le	0	0	0	0	0	0
Mz	0	0	0	0	0	0
Ni	0	0	0	0	0	0
To	0	0	0	0	1×10^2	$2 \times 10^1 \pm 4,4 \times 10^1$
Il	$4,47 \times 10^4$	$3,72 \times 10^4$	$2,23 \times 10^5$	$6,07 \times 10^4$	$2,51 \times 10^4$	$4,8 \times 10^5 \pm 9,78 \times 10^5$
Ca	$6,17 \times 10^4$	$3,52 \times 10^4$	$1,79 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$6,34 \times 10^4 \pm 2,24 \times 10^4$
Kot	$1,02 \times 10^5$	$9,22 \times 10^4$	$4,22 \times 10^5$	$1,79 \times 10^4$	$1,83 \times 10^4$	$1,9 \times 10^5 \pm 1,96 \times 10^5$

144h-Wert, Therapiegruppe 2

Organ	Tiernummer 3/6	3/7	3/8	3/9	3/10	Mittelwert +/-s
Le	0	0	0	0	0	0
Mz	0	0	0	0	0	0
Ni	0	0	0	0	0	0
To	0	0	0	0	0	0
Il	$3,5 \times 10^3$	$6,3 \times 10^2$	$7,2 \times 10^3$	$6,87 \times 10^3$	$3,95 \times 10^4$	$1,15 \times 10^4 \pm 1,59 \times 10^4$
Ca	$1,98 \times 10^4$	$7,5 \times 10^3$	$3,49 \times 10^4$	$7,95 \times 10^3$	$3,32 \times 10^4$	$2,07 \times 10^4 \pm 1,32 \times 10^4$
Kot	$2,23 \times 10^4$	$1,06 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$	$1,46 \times 10^4$	$1,26 \times 10^4$	$2,06 \times 10^4 \pm 1,33 \times 10^4$

Zu 4.4.4.1 Therapieversuch mit PY 100, intraperitoneale Gabe**6h-Wert, Kontrollgruppe**

Organ	Tiernummer 1/1	1/2	1/3	1/4	1/5	Mittelwert +/-s
Le	$1,5 \times 10^2$	2×10^2	0	2×10^2	$1,93 \times 10^3$	$4,96 \times 10^2 \pm 8,06 \times 10^2$
Mz	0	$1,5 \times 10^2$	0	5×10^1	7×10^2	$1,8 \times 10^2 \pm 2,75 \times 10^2$
Ni	0	$4,5 \times 10^2$	0	5×10^1	$6,5 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2 \pm 3,0 \times 10^2$
To	$5,1 \times 10^3$	8×10^2	5×10^1	$1,25 \times 10^3$	2×10^2	$1,48 \times 10^3 \pm 2,08 \times 10^3$
Il	4×10^4	2×10^4	$5,33 \times 10^5$	$1,07 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	$3,57 \times 10^5 \pm 4,5 \times 10^5$
Ca	$2,85 \times 10^6$	$2,3 \times 10^8$	$2,2 \times 10^9$	$5,82 \times 10^9$	$1,18 \times 10^9$	$1,89 \times 10^9 \pm 2,36 \times 10^9$
Kot	$1,97 \times 10^8$	$5,7 \times 10^8$	$5,78 \times 10^9$	$4,01 \times 10^9$	$4,75 \times 10^8$	$2,21 \times 10^9 \pm 2,54 \times 10^9$

24h-Wert, Kontrollgruppe

Organ	Tiernummer 1/6	1/7	1/8	1/9	1/10	Mittelwert +/-s
Le	0	0	0	0	0	0
Mz	0	5×10^1	0	0	0	$1 \times 10^1 \pm 2,2 \times 10^1$
Ni	0	0	0	0	0	0
To	0	1×10^1	2×10^1	1×10^1	0	$8 \times 10^0 \pm 8,37 \times 10^0$
Il	6×10^4	$3,5 \times 10^4$	$1,43 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$	2×10^4	$5,67 \times 10^4 \pm 5,07 \times 10^4$
Ca	5×10^4	$3,39 \times 10^7$	$4,5 \times 10^4$	$1,17 \times 10^5$	$4,1 \times 10^5$	$6,9 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^7$
Kot	$3,25 \times 10^5$	$7,6 \times 10^6$	$2,2 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$6,63 \times 10^5$	$1,79 \times 10^6 \pm 3,26 \times 10^6$

72h-Wert, Kontrollgruppe

Organ	Tiernummer 1/11	1/12	1/13	1/14	1/15	Mittelwert +/-s
Le	$2,38 \times 10^4$	0	0	4×10^2	3×10^2	$4,9 \times 10^3 \pm 1,06 \times 10^3$
Mz	0	0	0	$4,5 \times 10^2$	0	$9 \times 10^1 \pm 2,0 \times 10^1$
Ni	0	$2,5 \times 10^2$	0	$2,1 \times 10^3$	0	$4,7 \times 10^2 \pm 9,17 \times 10^2$
To	0	$3,8 \times 10^3$	$1,26 \times 10^4$	0	0	$3,28 \times 10^3 \pm 5,46 \times 10^3$
Il	$7,88 \times 10^9$	6×10^9	$2,43 \times 10^9$	$7,49 \times 10^9$	$9,23 \times 10^9$	$6,61 \times 10^9 \pm 2,6 \times 10^9$
Ca	$1,99 \times 10^{10}$	$3,68 \times 10^{10}$	$2,8 \times 10^{10}$	$5,25 \times 10^{11}$	$1,85 \times 10^{10}$	$1,25 \times 10^{11} \pm 2,23 \times 10^{11}$
Kot	$7,35 \times 10^9$	$2,83 \times 10^{10}$	$2,75 \times 10^{10}$	$1,24 \times 10^{11}$	$2,46 \times 10^9$	$3,79 \times 10^{10} \pm 4,95 \times 10^{10}$

144h-Wert, Kontrollgruppe

Organ	Tiernummer 1/16	1/17	1/18	1/19	1/20	Mittelwert +/-s
Le	0	0	0	0	0	0
Mz	0	0	0	0	0	0
Ni	0	0	0	0	0	0
To	0	0	0	0	0	0
Il	$7,25 \times 10^4$	$2,93 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4$	$2,13 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$	$2,26 \times 10^4 \pm 2,89 \times 10^4$
Ca	$1,82 \times 10^5$	$4,87 \times 10^4$	$7,2 \times 10^4$	$2,45 \times 10^5$	$1,06 \times 10^5$	$1,31 \times 10^5 \pm 8,1 \times 10^4$
Kot	$6,48 \times 10^4$	$2,75 \times 10^3$	$1,82 \times 10^4$	$1,07 \times 10^5$	$1,24 \times 10^4$	$4,1 \times 10^4 \pm 4,39 \times 10^4$

Zu 4.4.4.1 Therapieversuch mit PY 100, intraperitoneale Gabe**6h-Wert, Therapiegruppe 1**

Organ	Tiernummer 2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	Mittelwert +/-s
Le	$4,4 \times 10^3$	$8,7 \times 10^3$	$1,45 \times 10^3$	$2,5 \times 10^2$	$5,5 \times 10^2$	$3,07 \times 10^3 \pm 3,55 \times 10^3$
Mz	1×10^2	0	$1,85 \times 10^3$	0	5×10^1	$4 \times 10^2 \pm 8,17 \times 10^2$
Ni	$4,5 \times 10^2$	$1,55 \times 10^4$	$3,58 \times 10^3$	5×10^1	$1,6 \times 10^3$	$4,24 \times 10^3 \pm 6,44 \times 10^3$
To	$1,53 \times 10^4$	$1,08 \times 10^4$	$8,3 \times 10^3$	$3,33 \times 10^3$	$1,54 \times 10^4$	$1,06 \times 10^4 \pm 5,08 \times 10^3$
Il	$4,28 \times 10^5$	$1,53 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$	$2,47 \times 10^5$	1×10^4	$2,46 \times 10^5 \pm 1,72 \times 10^5$
Ca	$6,35 \times 10^9$	$5,08 \times 10^9$	$7,88 \times 10^8$	$1,43 \times 10^{10}$	$1,21 \times 10^{10}$	$7,72 \times 10^9 \pm 5,46 \times 10^9$
Kot	$4,73 \times 10^9$	$3,34 \times 10^8$	$3,87 \times 10^7$	$2,12 \times 10^7$	$2,08 \times 10^6$	$9,65 \times 10^8 \pm 2,08 \times 10^8$

24h-Wert, Therapiegruppe 1

Organ	Tiernummer 2/6	2/7	2/8	2/9	2/10	Mittelwert +/-s
Le	0	0	0	0	5×10^1	$1 \times 10^2 \pm 2,2 \times 10^1$
Mz	0	0	$5,5 \times 10^2$	0	0	$1,1 \times 10^2 \pm 2,46 \times 10^2$
Ni	0	0	0	0	0	0
To	$1,05 \times 10^4$	$8,5 \times 10^2$	0	1×10^2	$1,45 \times 10^4$	$5,19 \times 10^3 \pm 6,85 \times 10^3$
Il	$7,3 \times 10^4$	$1,25 \times 10^5$	1×10^5	$7,75 \times 10^4$	$8,05 \times 10^5$	$2,36 \times 10^5 \pm 3,19 \times 10^5$
Ca	$1,7 \times 10^7$	$1,71 \times 10^6$	0	$3,06 \times 10^6$	$1,61 \times 10^5$	$4,39 \times 10^6 \pm 7,41 \times 10^6$
Kot	$2,02 \times 10^7$	$1,51 \times 10^6$	$4,67 \times 10^6$	$1,11 \times 10^6$	$1,62 \times 10^6$	$5,82 \times 10^6 \pm 8,16 \times 10^6$

72h-Wert, Therapiegruppe 1

Organ	Tiernummer 2/11	2/12	2/13	2/14	2/15	Mittelwert +/-s
Le	0	0	0	6×10^2	$1,35 \times 10^3$	$1,46 \times 10^2 \pm 2,6 \times 10^2$
Mz	0	0	0	$1,9 \times 10^3$	0	$3,8 \times 10^2 \pm 8,5 \times 10^2$
Ni	0	0	0	$2,54 \times 10^3$	0	$5,08 \times 10^2 \pm 1,1 \times 10^2$
To	0	0	0	0	$2,15 \times 10^3$	$4,3 \times 10^2 \pm 9,62 \times 10^2$
Il	$5,37 \times 10^9$	$5,14 \times 10^{10}$	$1,29 \times 10^{10}$	$5,68 \times 10^{10}$	$5,01 \times 10^{10}$	$3,53 \times 10^{10} \pm 2,42 \times 10^{10}$
Ca	$4,36 \times 10^5$	$4,4 \times 10^{10}$	$3,93 \times 10^{10}$	$3,99 \times 10^{11}$	$1,12 \times 10^{11}$	$1,12 \times 10^{11} \pm 1,61 \times 10^{11}$
Kot	$5,4 \times 10^{10}$	$1,95 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^{10}$	$2,55 \times 10^{10}$	$3,37 \times 10^{10}$	$3,37 \times 10^{10} \pm 1,31 \times 10^{10}$

144h-Wert, Therapiegruppe 1

Organ	Tiernummer 2/16	2/17	2/18	2/19	2/20	Mittelwert +/-s
Le	0	0	0	0	0	0
Mz	0	0	0	0	0	0
Ni	0	0	0	0	0	0
To	0	0	0	0	0	0
Il	$1,11 \times 10^5$	$1,95 \times 10^3$	$7,3 \times 10^5$	$4,9 \times 10^3$	$2,61 \times 10^5$	$2,22 \times 10^5 \pm 3,03 \times 10^5$
Ca	$4,72 \times 10^4$	$1,18 \times 10^5$	$6,33 \times 10^5$	$6,12 \times 10^4$	$2,59 \times 10^4$	$1,7 \times 10^5 \pm 2,57 \times 10^5$
Kot	$3,28 \times 10^4$	$4,83 \times 10^6$	$4,34 \times 10^6$	$4,27 \times 10^5$	$6,75 \times 10^4$	$1,94 \times 10^6 \pm 2,43 \times 10^6$

Zu 4.4.4.1 Therapieversuch mit PY 100, intraperitoneale Gabe

72h-Wert, Therapiegruppe 2

Organ	Tiernummer 3/1	3/2	3/3	3/4	3/5	Mittelwert +/-s
Le	5×10^2	0	0	0	0	$1 \times 10^1 \pm 2,23 \times 10^1$
Mz	5×10^2	0	0	0	0	$1 \times 10^1 \pm 2,23 \times 10^1$
Ni	0	0	0	0	0	0
To	0	0	0	0	0	0
Il	$1,23 \times 10^5$	$1,58 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	$7,5 \times 10^4$	3×10^4	$6,67 \times 10^4 \pm 6,06 \times 10^4$
Ca	$4,5 \times 10^4$	$1,58 \times 10^5$	$4,58 \times 10^5$	$9,5 \times 10^4$	$1,9 \times 10^5$	$1,89 \times 10^5 \pm 1,6 \times 10^5$
Kot	1×10^4	$2,2 \times 10^5$	$4,58 \times 10^5$	$5,55 \times 10^5$	$1,025 \times 10^5$	$2,69 \times 10^5 \pm 2,32 \times 10^5$

144h-Wert, Therapiegruppe 2

Organ	Tiernummer 3/6	3/7	3/8	3/9	3/10	Mittelwert +/-s
Le	0	6×10^2	0	0	5×10^1	$1,3 \times 10^2 \pm 2,64 \times 10^2$
Mz	$3,5 \times 10^2$	1×10^2	0	0	0	$9 \times 10^1 \pm 1,52 \times 10^1$
Ni	0	1×10^2	0	0	0	$2 \times 10^1 \pm 4,47 \times 10^1$
To	0	0	0	0	0	0
Il	$3,05 \times 10^9$	$1,02 \times 10^{10}$	$2,08 \times 10^{10}$	$3,14 \times 10^9$	$8,7 \times 10^9$	$8,77 \times 10^9 \pm 7,25 \times 10^9$
Ca	$4,46 \times 10^6$	$2,91 \times 10^5$	$1,75 \times 10^6$	$7,18 \times 10^4$	$1,41 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6 \pm 1,75 \times 10^6$
Kot	$4,03 \times 10^{10}$	$3,63 \times 10^{10}$	$3,98 \times 10^{10}$	$4,75 \times 10^{10}$	$1,65 \times 10^{10}$	$3,61 \times 10^{10} \pm 1,17 \times 10^{10}$

Zu 4.4.4.2 Therapieversuch mit PY 100, einmalige intraperitoneale Gabe**6h-Wert, Kontrollgruppe**

Organ	Tiernummer 1/1	1/2	1/3	1/4	1/5	Mittelwert +/-s
Le	$5,7 \times 10^4$	$4,95 \times 10^4$	$4,85 \times 10^4$	$6,15 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$	$6,9 \times 10^4 \pm 3,44 \times 10^4$
Mz	$2,9 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$	$4,25 \times 10^4$	$5,95 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$	$5,5 \times 10^4 \pm 3,25 \times 10^4$
Ni	$2,9 \times 10^4$	$4,8 \times 10^4$	$4,05 \times 10^4$	$5,65 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$	$5,68 \times 10^4 \pm 3,14 \times 10^4$
To	$3,4 \times 10^4$	$2,55 \times 10^4$	$3,7 \times 10^4$	$5,6 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$	$5,25 \times 10^4 \pm 3,4 \times 10^4$
Il	4×10^5	$9,3 \times 10^7$	$2,01 \times 10^8$	$2,6 \times 10^7$	$2,5 \times 10^8$	$1,94 \times 10^8 \pm 1,45 \times 10^8$
Ca	$5,15 \times 10^7$	$3,66 \times 10^7$	$5,45 \times 10^7$	$1,15 \times 10^8$	$1,48 \times 10^8$	$8,11 \times 10^7 \pm 4,79 \times 10^7$
Kot	$2,84 \times 10^8$	$3,11 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$3,02 \times 10^8$	$1,77 \times 10^8 \pm 1,17 \times 10^8$

12h-Wert, Kontrollgruppe

Organ	Tiernummer 1/6	1/7	1/8	1/9	1/10	Mittelwert +/-s
Le	0	5×10^2	$2,5 \times 10^2$	2×10^4	$1,85 \times 10^4$	$7,85 \times 10^3 \pm 1,04 \times 10^3$
Mz	5×10^2	5×10^2	5×10^2	$6,5 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4$	$4,2 \times 10^3 \pm 5,56 \times 10^3$
Ni	5×10^2	1×10^3	7×10^2	$1,4 \times 10^4$	$2,15 \times 10^4$	$7,54 \times 10^3 \pm 6,69 \times 10^3$
To	5×10^1	4×10^2	$3,95 \times 10^2$	$1,1 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	$5,77 \times 10^3 \pm 7,8 \times 10^3$
Il	$1,5 \times 10^5$	$9,5 \times 10^2$	$3,03 \times 10^4$	$1,6 \times 10^7$	$1,95 \times 10^6$	$3,63 \times 10^6 \pm 6,97 \times 10^6$
Ca	$7,5 \times 10^6$	$4,25 \times 10^7$	$3,6 \times 10^6$	$1,8 \times 10^7$	1×10^7	$1,63 \times 10^7 \pm 1,56 \times 10^7$
Kot	$6,5 \times 10^6$	$3,11 \times 10^7$	4×10^6	$1,82 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7 \pm 1,17 \times 10^7$

24h-Wert, Kontrollgruppe

Organ	Tiernummer 1/11	1/12	1/13	1/14	1/15	Mittelwert +/-s
Le	0	$2,4 \times 10^3$	0	0	0	$4,8 \times 10^2 \pm 1,07 \times 10^2$
Mz	0	$2,3 \times 10^3$	0	0	0	$4,6 \times 10^2 \pm 1,03 \times 10^2$
Ni	0	3×10^2	0	0	0	$6 \times 10^1 \pm 1,34 \times 10^1$
To	0	$1,71 \times 10^4$	0	0	0	$3,42 \times 10^3 \pm 7,6 \times 10^3$
Il	$8,7 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	$2,2 \times 10^6$	$1,21 \times 10^5$	$3,7 \times 10^6$	$1,25 \times 10^6 \pm 1,35 \times 10^6$
Ca	$6,8 \times 10^5$	$1,38 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$1,97 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$	$3,99 \times 10^5 \pm 2,9 \times 10^5$
Kot	$7,9 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	$4,7 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	$3,78 \times 10^5 \pm 2,4 \times 10^5$

48h-Wert, Kontrollgruppe

Organ	Tiernummer 1/16	1/17	1/18	1/19	1/20	Mittelwert +/-s
Le	0	0	0	0	0	0
Mz	0	0	0	5×10^2	0	$1 \times 10^2 \pm 2,2 \times 10^2$
Ni	0	5×10^2	0	0	0	$1 \times 10^2 \pm 2,2 \times 10^2$
To	$1,75 \times 10^5$	$1,5 \times 10^2$	2×10^2	0	0	$3,5 \times 10^4 \pm 7,8 \times 10^4$
Il	$1,2 \times 10^5$	$4,9 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$5,9 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	$3,54 \times 10^5 \pm 2,2 \times 10^5$
Ca	$4,5 \times 10^5$	$5,2 \times 10^6$	$2,07 \times 10^6$	7×10^6	$8,1 \times 10^6$	$4,56 \times 10^6 \pm 3,2 \times 10^6$
Kot	$2,1 \times 10^6$	$7,45 \times 10^6$	$1,57 \times 10^6$	$1,51 \times 10^7$	1×10^6	$5,44 \times 10^6 \pm 5,98 \times 10^6$

Zu 4.4.4.2 Therapieversuch mit PY 100, einmalige intraperitoneale Gabe**6h-Wert, Therapiegruppe**

Organ	Tiernummer 2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	Mittelwert +/-s
Le	$4,1 \times 10^4$	$4,7 \times 10^4$	$3,25 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$3,35 \times 10^4 \pm 1,05 \times 10^4$
Mz	$3,1 \times 10^4$	$3,4 \times 10^4$	$3,35 \times 10^4$	$1,35 \times 10^4$	$2,45 \times 10^4$	$2,73 \times 10^4 \pm 8,6 \times 10^3$
Ni	$3,85 \times 10^4$	$4,25 \times 10^4$	$3,35 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$2,05 \times 10^4$	$2,96 \times 10^4 \pm 1,24 \times 10^4$
To	$3,7 \times 10^4$	$3,33 \times 10^4$	$3,75 \times 10^4$	$1,45 \times 10^4$	$3,15 \times 10^4$	$3,08 \times 10^4 \pm 9,4 \times 10^3$
Il	$2,82 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$6,4 \times 10^8$	$9,5 \times 10^8$	$4,8 \times 10^7$	$2,32 \times 10^8 \pm 2,5 \times 10^8$
Ca	$5,7 \times 10^8$	$6,65 \times 10^7$	$2,44 \times 10^8$	$7,95 \times 10^7$	$7,06 \times 10^8$	$3,33 \times 10^8 \pm 2,9 \times 10^8$
Kot	$8,07 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$	$6,05 \times 10^7$	$7,35 \times 10^7$	$1,68 \times 10^8$	$3,72 \times 10^8 \pm 3,7 \times 10^8$

12h-Wert, Therapiegruppe

Organ	Tiernummer 2/6	2/7	2/8	2/9	2/10	Mittelwert +/-s
Le	0	7×10^2	5×10^1	$5,5 \times 10^2$	$7,5 \times 10^2$	$4,1 \times 10^2 \pm 3,6 \times 10^2$
Mz	2×10^3	$2,5 \times 10^2$	2×10^2	7×10^2	$5,5 \times 10^2$	$7,4 \times 10^2 \pm 7,3 \times 10^2$
Ni	1×10^3	$7,5 \times 10^2$	2×10^2	8×10^2	$1,03 \times 10^3$	$7,56 \times 10^2 \pm 3,3 \times 10^2$
To	$3,18 \times 10^3$	2×10^2	$1,5 \times 10^2$	5×10^2	$1,5 \times 10^3$	$1,11 \times 10^3 \pm 1,3 \times 10^3$
Il	7×10^5	2×10^4	$2,25 \times 10^5$	1×10^5	$2,53 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5 \pm 2,64 \times 10^5$
Ca	$6,28 \times 10^7$	$2,09 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	$2,26 \times 10^7$	$2,97 \times 10^7 \pm 1,9 \times 10^7$
Kot	$3,73 \times 10^6$	$1,35 \times 10^7$	$1,15 \times 10^7$	$1,95 \times 10^7$	$6,48 \times 10^6$	$1,09 \times 10^7 \pm 6,2 \times 10^6$

24h-Wert, Therapiegruppe

Organ	Tiernummer 2/11	2/12	2/13	2/14	2/15	Mittelwert +/-s
Le	0	0	1×10^2	0	0	$2 \times 10^1 \pm 4,5 \times 10^1$
Mz	0	0	5×10^1	0	0	$1 \times 10^1 \pm 2,2 \times 10^1$
Ni	0	0	0	0	0	0
To	0	0	0	0	0	0
Il	$5,5 \times 10^4$	$2,47 \times 10^5$	$1,55 \times 10^5$	$7,4 \times 10^5$	$2,47 \times 10^5$	$1,46 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$
Ca	$1,8 \times 10^5$	$6,8 \times 10^5$	$8,5 \times 10^5$	$1,9 \times 10^6$	6×10^5	$8,42 \times 10^5 \pm 6,4 \times 10^5$
Kot	$2,4 \times 10^6$	$7,3 \times 10^5$	$5,6 \times 10^5$	$3,41 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	$1,74 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^6$

48h-Wert, Therapiegruppe

Organ	Tiernummer 2/16	2/17	2/18	2/19	2/20	Mittelwert +/-s
Le	0	1×10^2	0	3×10^2	0	$8 \times 10^1 \pm 1,3 \times 10^1$
Mz	$6,5 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	0	0	0	$1,6 \times 10^2 \pm 2,8 \times 10^2$
Ni	0	0	0	0	0	0
To	0	0	0	0	0	0
Il	$7,95 \times 10^6$	$1,07 \times 10^7$	$4,3 \times 10^6$	$4,1 \times 10^6$	$2,82 \times 10^6$	$5,97 \times 10^6 \pm 3,3 \times 10^6$
Ca	$4,53 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$1,44 \times 10^7$	$5,6 \times 10^6$	$7,57 \times 10^6$	$7,12 \times 10^6 \pm 4,3 \times 10^6$
Kot	$8,05 \times 10^6$	$7,91 \times 10^6$	$3,95 \times 10^6$	$5,6 \times 10^6$	7×10^6	$6,5 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^6$

Zu 4.4.4.3.1 Therapieversuch mit PY 100, einmalige orale Gabe

6h-Wert, Kontrollgruppe

Organ	Tiernummer 1/1	1/2	1/3	1/4	1/5	Mittelwert +/-s
Le	0	0	$2,28 \times 10^3$	0	0	$4,56 \times 10^2 \pm 1,0 \times 10^3$
Mz	0	0	$3,95 \times 10^3$	0	$4,2 \times 10^3$	$1,63 \times 10^3 \pm 2,2 \times 10^3$
Ni	$1,5 \times 10^2$	0	1×10^2	0	$3,2 \times 10^2$	$1,14 \times 10^2 \pm 1,3 \times 10^2$
To	5×10^1	5×10^1	3×10^1	$7,75 \times 10^2$	2×10^2	$2,21 \times 10^2 \pm 3,2 \times 10^2$
Il	$3,23 \times 10^5$	6×10^4	4×10^5	$1,7 \times 10^5$	2×10^5	$4,65 \times 10^5 \pm 6,6 \times 10^5$
Ca	$2,31 \times 10^7$	$1,73 \times 10^7$	$8,9 \times 10^7$	$7,28 \times 10^7$	$4,4 \times 10^7$	$4,92 \times 10^7 \pm 3,1 \times 10^7$
Kot	$2,18 \times 10^7$	$4,74 \times 10^7$	$2,93 \times 10^7$	$4,23 \times 10^7$	$2,65 \times 10^7$	$3,35 \times 10^7 \pm 1,1 \times 10^7$

12h-Wert, Kontrollgruppe

Organ	Tiernummer 1/6	1/7	1/8	1/9	1/10	Mittelwert +/-s
Le	0	0	0	0	5×10^1	$1 \times 10^1 \pm 2,2 \times 10^1$
Mz	0	1×10^2	0	0	1×10^2	$4 \times 10^1 \pm 5,5 \times 10^1$
Ni	0	0	0	5×10^1	1×10^2	$3 \times 10^1 \pm 4,5 \times 10^1$
To	1×10^2	$5,6 \times 10^3$	0	$1,95 \times 10^3$	$4,5 \times 10^2$	$1,6 \times 10^3 \pm 2,4 \times 10^3$
Il	$4,85 \times 10^5$	$1,99 \times 10^2$	$6,8 \times 10^5$	$2,44 \times 10^5$	$3,14 \times 10^5$	$3,84 \times 10^5 \pm 2,56 \times 10^5$
Ca	$1,26 \times 10^7$	$2,85 \times 10^5$	$3,33 \times 10^5$	$3,13 \times 10^7$	$2,65 \times 10^5$	$1,05 \times 10^7 \pm 1,23 \times 10^7$
Kot	$1,45 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$	$2,19 \times 10^7$	$6,5 \times 10^7$	$2,37 \times 10^7$	$2,96 \times 10^7 \pm 2,0 \times 10^7$

24h-Wert, Kontrollgruppe

Organ	Tiernummer 1/11	1/12	1/13	1/14	1/15	Mittelwert +/-s
Le	0	0	0	1×10^2	0	$2 \times 10^1 \pm 4,47 \times 10^1$
Mz	0	0	0	1×10^2	0	$2 \times 10^1 \pm 4,47 \times 10^1$
Ni	0	0	0	0	0	0
To	0	0	0	$8,4 \times 10^4$	$3,5 \times 10^2$	$1,69 \times 10^4 \pm 3,7 \times 10^4$
Il	$2,58 \times 10^5$	5×10^4	$1,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$6,3 \times 10^5$	$1,84 \times 10^5 \pm 2,7 \times 10^5$
Ca	$2,21 \times 10^7$	$5,9 \times 10^7$	$2,11 \times 10^7$	1×10^5	$2,25 \times 10^5$	$2,11 \times 10^7 \pm 2,3 \times 10^7$
Kot	$1,36 \times 10^5$	$2,3 \times 10^7$	$3,8 \times 10^5$	$1,58 \times 10^5$	$2,25 \times 10^5$	$6,4 \times 10^5 \pm 9,3 \times 10^5$

48h-Wert, Kontrollgruppe

Organ	Tiernummer 1/16	1/17	1/18	1/19	1/20	Mittelwert +/-s
Le	0	$1,7 \times 10^3$	0	1×10^2	0	$3,4 \times 10^3 \pm 7,5 \times 10^2$
Mz	0	6×10^2	0	0	0	$1,2 \times 10^2 \pm 2,68 \times 10^2$
Ni	0	0	0	5×10^1	0	$1 \times 10^1 \pm 2,2 \times 10^1$
To	0	$1,68 \times 10^4$	0	0	0	$3,36 \times 10^3 \pm 7,5 \times 10^3$
Il	$4,98 \times 10^5$	$8,75 \times 10^5$	$5,98 \times 10^5$	$2,8 \times 10^7$	$1,89 \times 10^7$	$1,09 \times 10^7 \pm 1,2 \times 10^7$
Ca	$4,7 \times 10^5$	$1,36 \times 10^7$	$3,53 \times 10^5$	$1,86 \times 10^7$	$8,3 \times 10^5$	$9,75 \times 10^5 \pm 6,3 \times 10^5$
Kot	$1,62 \times 10^7$	$4,32 \times 10^5$	$1,18 \times 10^7$	$4,08 \times 10^7$	$3,14 \times 10^7$	$2,09 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^7$

Zu 4.4.4.3.1 Therapieversuch mit PY 100, einmalige orale Gabe**6h-Wert, Therapiegruppe**

Organ	Tiernummer 2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	Mittelwert +/-s
Le	0	0	5×10^1	5×10^1	$5,5 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2 \pm 2,4 \times 10^2$
Mz	0	0	0	0	5×10^1	$1 \times 10^1 \pm 2,2 \times 10^1$
Ni	0	0	0	0	$1,2 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2 \pm 5,4 \times 10^2$
To	$1,25 \times 10^3$	1×10^2	0	$6,55 \times 10^3$	$1,54 \times 10^4$	$4,66 \times 10^3 \pm 6,6 \times 10^3$
Il	$1,43 \times 10^5$	$1,84 \times 10^5$	$3,53 \times 10^5$	$5,04 \times 10^5$	$5,7 \times 10^5$	$1,59 \times 10^5 \pm 2,0 \times 10^5$
Ca	$4,42 \times 10^5$	$3,08 \times 10^5$	$1,65 \times 10^7$	$1,7 \times 10^5$	$1,45 \times 10^7$	$8,04 \times 10^5 \pm 6,9 \times 10^5$
Kot	$5,48 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$	$2,85 \times 10^7$	$2,23 \times 10^5$	$4,1 \times 10^5$	$8,21 \times 10^5 \pm 1,15 \times 10^5$

12h-Wert, Therapiegruppe

Organ	Tiernummer 2/6	2/7	2/8	2/9	2/10	Mittelwert +/-s
Le	2×10^2	0	0	0	0	$4 \times 10^1 \pm 8,9 \times 10^1$
Mz	0	0	0	0	0	0
Ni	0	0	0	5×10^1	0	$1 \times 10^1 \pm 2,2 \times 10^1$
To	5×10^1	0	0	$9,25 \times 10^3$	$1,45 \times 10^4$	$4,76 \times 10^3 \pm 6,8 \times 10^3$
Il	$5,56 \times 10^5$	$2,52 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$2,45 \times 10^5$	$5,75 \times 10^5$	$1,36 \times 10^5 \pm 2,35 \times 10^5$
Ca	$1,93 \times 10^5$	$1,27 \times 10^7$	$4,5 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	$5,8 \times 10^7$	$1,63 \times 10^7 \pm 2,4 \times 10^7$
Kot	$2,75 \times 10^5$	$1,48 \times 10^7$	$1,19 \times 10^7$	$2,04 \times 10^7$	$1,49 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7 \pm 6,4 \times 10^7$

24h-Wert, Therapiegruppe

Organ	Tiernummer 2/11	2/12	2/13	2/14	2/15	Mittelwert +/-s
Le	0	0	0	5×10^1	0	$1 \times 10^1 \pm 2,2 \times 10^1$
Mz	0	0	0	$3,25 \times 10^3$	$1,5 \times 10^2$	$6,8 \times 10^2 \pm 1,4 \times 10^2$
Ni	0	0	0	0	1×10^2	$2 \times 10^1 \pm 4,5 \times 10^1$
To	0	0	0	$2,5 \times 10^2$	$2,05 \times 10^3$	$4,6 \times 10^2 \pm 9 \times 10^2$
Il	$4,5 \times 10^5$	$2,9 \times 10^7$	$3,73 \times 10^5$	$5,23 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$	$8,46 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^7$
Ca	$2,95 \times 10^5$	$2,35 \times 10^5$	$2,11 \times 10^7$	$3,75 \times 10^5$	$6,98 \times 10^7$	$2 \times 10^7 \pm 2,89 \times 10^7$
Kot	$1,8 \times 10^5$	$1,28 \times 10^7$	$2,23 \times 10^5$	$3,98 \times 10^5$	$1,73 \times 10^5$	$4,51 \times 10^5 \pm 4,7 \times 10^5$

48h-Wert, Therapiegruppe

Organ	Tiernummer 2/16	2/17	2/18	2/19	2/20	Mittelwert +/-s
Le	0	0	1×10^2	1×10^2	0	$4 \times 10^1 \pm 5,5 \times 10^1$
Mz	0	0	0	0	0	0
Ni	0	0	0	0	0	0
To	0	0	0	0	0	0
Il	$1,57 \times 10^5$	$2,84 \times 10^7$	$4,04 \times 10^7$	$4,52 \times 10^5$	$3,59 \times 10^7$	$2,22 \times 10^7 \pm 1,8 \times 10^7$
Ca	$1,5 \times 10^5$	$3,69 \times 10^5$	$4,82 \times 10^7$	$2,61 \times 10^5$	$5,48 \times 10^7$	$2,49 \times 10^7 \pm 2,2 \times 10^7$
Kot	$1,46 \times 10^7$	$2,98 \times 10^7$	$7,15 \times 10^7$	$1,96 \times 10^8$	$7,77 \times 10^7$	$7,79 \times 10^7 \pm 7,1 \times 10^7$

Zu 4.4.4.3.2 Therapieversuch mit PY 100, mehrfache orale Gabe**24h-Wert, Kontrollgruppe**

Organ	Tiernummer 1/1	1/2	1/3	1/4	1/5	Mittelwert +/-s
Le	0	0	0	2×10^2	0	4×10^1 +/- $8,9 \times 10^1$
Mz	0	0	0	0	0	0
Ni	0	0	0	0	0	0
To	$1,05 \times 10^3$	0	$1,3 \times 10^4$	0	5×10^1	$2,84 \times 10^3$ +/- $5,7 \times 10^3$
Il	$2,5 \times 10^7$	$2,37 \times 10^7$	$5,55 \times 10^7$	$1,3 \times 10^6$	$1,66 \times 10^7$	$2,44 \times 10^7$ +/- 2×10^7
Ca	$3,88 \times 10^6$	$6,28 \times 10^6$	$3,13 \times 10^5$	$1,43 \times 10^6$	$1,68 \times 10^6$	$2,71 \times 10^6$ +/- $2,4 \times 10^6$
Kot	$2,07 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$1,23 \times 10^7$	$3,87 \times 10^7$	$1,83 \times 10^7$	$2,18 \times 10^7$ +/- $1,0 \times 10^7$

48h-Wert, Kontrollgruppe

Organ	Tiernummer 1/6	1/7	1/8	1/9	1/10	Mittelwert +/-s
Le	5×10^1	$2,9 \times 10^3$	0	0	1×10^3	$7,9 \times 10^2$ +/- $1,3 \times 10^2$
Mz	$1,5 \times 10^2$	$2,07 \times 10^4$	0	0	0	$4,44 \times 10^3$ +/- $9,1 \times 10^2$
Ni	0	$1,6 \times 10^3$	0	0	0	$3,2 \times 10^2$ +/- $7,5 \times 10^2$
To	0	0	0	3×10^2	0	6×10^1 +/- $1,3 \times 10^1$
Il	$3,9 \times 10^6$	$8,65 \times 10^7$	$3,54 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$4,7 \times 10^6$	$2,93 \times 10^7$ +/- $3,4 \times 10^7$
Ca	$3,83 \times 10^7$	$2,66 \times 10^7$	$6,05 \times 10^7$	$3,85 \times 10^7$	$1,91 \times 10^7$	$3,66 \times 10^7$ +/- $1,6 \times 10^7$
Kot	$1,54 \times 10^8$	$2,34 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	8×10^7	$4,92 \times 10^7$	$2,48 \times 10^8$ +/- $1,6 \times 10^7$

72h-Wert, Kontrollgruppe

Organ	Tiernummer 1/11	1/12	1/13	1/14	1/15	Mittelwert +/-s
Le	0	0	0	0	0	0
Mz	0	0	0	0	5×10^1	1×10^1 +/- $2,2 \times 10^1$
Ni	0	0	0	0	5×10^2	1×10^2 +/- $2,2 \times 10^1$
To	0	0	0	0	5×10^2	1×10^2 +/- $2,2 \times 10^1$
Il	$6,4 \times 10^7$	$9,95 \times 10^6$	$5,42 \times 10^7$	$3,4 \times 10^7$	$3,61 \times 10^7$	$3,97 \times 10^7$ +/- $2,08 \times 10^7$
Ca	$2,57 \times 10^7$	$5,45 \times 10^7$	$1,52 \times 10^7$	$2,18 \times 10^7$	$4,19 \times 10^7$	$3,18 \times 10^7$ +/- $1,6 \times 10^7$
Kot	$1,36 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$1,33 \times 10^8$	$1,62 \times 10^8$	$4,63 \times 10^7$	$4,75 \times 10^8$ +/- $5,4 \times 10^7$

96h-Wert, Kontrollgruppe

Organ	Tiernummer 1/16	1/17	1/18	1/19	1/20	Mittelwert +/-s
Le	4×10^2	$1,2 \times 10^3$	6×10^2	0	0	$4,4 \times 10^2$ +/- $5,0 \times 10^2$
Mz	1×10^2	$1,5 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	0	0	8×10^1 +/- $7,6 \times 10^1$
Ni	$1,5 \times 10^2$	3×10^2	0	0	0	9×10^1 +/- $1,34 \times 10^1$
To	2×10^2	$2,36 \times 10^4$	0	0	5×10^1	$4,77 \times 10^3$ +/- $1,1 \times 10^3$
Il	$4,4 \times 10^7$	$8,9 \times 10^7$	$4,06 \times 10^6$	$9,16 \times 10^7$	$2,75 \times 10^6$	$4,63 \times 10^7$ +/- $4,3 \times 10^7$
Ca	$3,72 \times 10^7$	$3,25 \times 10^7$	$3,28 \times 10^7$	$4,16 \times 10^7$	8×10^6	$3,04 \times 10^7$ +/- $1,31 \times 10^7$
Kot	$6,64 \times 10^7$	$7,94 \times 10^7$	$6,48 \times 10^7$	$7,36 \times 10^7$	$4,32 \times 10^7$	$6,55 \times 10^7$ +/- $1,38 \times 10^7$

Zu 4.4.4.3.2 Therapieversuch mit PY 100, mehrfache orale Gabe

170h-Wert, Kontrollgruppe

Organ	Tiernummer 1/21	1/22	1/23	1/24	1/25	Mittelwert +/-s
Le	0	0	0	0	0	0
Mz	0	0	0	0	0	0
Ni	0	0	0	0	0	0
To	9×10^2	1×10^2	0	$4,5 \times 10^2$	0	$2,9 \times 10^2 \pm 3,9 \times 10^2$
Il	$3,85 \times 10^6$	$1,41 \times 10^7$	$5,77 \times 10^7$	$5,9 \times 10^6$	$7,2 \times 10^7$	$3,07 \times 10^7 \pm 3,18 \times 10^7$
Ca	$1,15 \times 10^7$	$9,9 \times 10^6$	$3,1 \times 10^7$	$2,81 \times 10^7$	$5,1 \times 10^7$	$2,63 \times 10^7 \pm 2,63 \times 10^7$
Kot	$1,28 \times 10^8$	$1,06 \times 10^7$	$1,8 \times 10^8$	$1,03 \times 10^8$	$1,14 \times 10^8$	$1,07 \times 10^8 \pm 1,07 \times 10^8$

Zu 4.4.4.3.2 Therapieversuch mit PY 100, mehrfache orale Gabe**24h-Wert, Therapiegruppe**

Organ	Tiernummer 2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	Mittelwert +/-s
Le	1×10^2	0	0	0	0	2×10^1 +/- $4,5 \times 10^1$
Mz	0	0	0	0	0	0
Ni	1×10^2	0	0	0	0	2×10^1 +/- $4,5 \times 10^1$
To	$6,5 \times 10^2$	$1,46 \times 10^4$	0	0	0	$3,05 \times 10^3$ +/- $6,5 \times 10^3$
Il	$6,4 \times 10^5$	$1,01 \times 10^8$	$7,78 \times 10^5$	$4,13 \times 10^5$	$5,23 \times 10^5$	$2,2 \times 10^7$ +/- $4,4 \times 10^7$
Ca	$4,5 \times 10^5$	$2,23 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	5×10^5	$1,35 \times 10^6$ +/- $1,4 \times 10^6$
Kot	$3,45 \times 10^5$	$9,6 \times 10^5$	$6,9 \times 10^7$	$5,22 \times 10^5$	$3,45 \times 10^5$	$2,06 \times 10^7$ +/- $3,2 \times 10^7$

48h-Wert, Therapiegruppe

Organ	Tiernummer 2/6	2/7	2/8	2/9	2/10	Mittelwert +/-s
Le	0	$2,85 \times 10^3$	1×10^2	0	0	$5,9 \times 10^2$ +/- $1,3 \times 10^2$
Mz	0	$2,89 \times 10^4$	0	0	0	$5,78 \times 10^3$ +/- $1,3 \times 10^3$
Ni	0	$4,5 \times 10^2$	0	0	0	9×10^2 +/- $2,0 \times 10^2$
To	0	0	5×10^1	0	0	1×10^1 +/- $2,2 \times 10^1$
Il	$1,74 \times 10^7$	$3,95 \times 10^5$	$1,85 \times 10^7$	$4,7 \times 10^7$	$2,03 \times 10^7$	$2,14 \times 10^7$ +/- $1,6 \times 10^7$
Ca	$3,3 \times 10^5$	$1,37 \times 10^7$	$1,56 \times 10^7$	$1,43 \times 10^7$	$2,08 \times 10^7$	$1,36 \times 10^7$ +/- $6,4 \times 10^6$
Kot	$1,82 \times 10^7$	$1,33 \times 10^7$	$3,71 \times 10^7$	$1,18 \times 10^8$	$2,9 \times 10^7$	$4,31 \times 10^7$ +/- $4,3 \times 10^7$

72h-Wert, Therapiegruppe

Organ	Tiernummer 2/11	2/12	2/13	2/14	2/15	Mittelwert +/-s
Le	0	1×10^2	$1,6 \times 10^2$	0	0	$5,2 \times 10^1$ +/- $7,4 \times 10^1$
Mz	0	0	0	0	0	0
Ni	0	$3,55 \times 10^3$	0	0	0	$7,1 \times 10^2$ +/- $1,6 \times 10^2$
To	0	0	0	0	0	0
Il	$1,13 \times 10^8$	$2,06 \times 10^8$	$1,53 \times 10^8$	$3,6 \times 10^5$	$8,7 \times 10^7$	$1,13 \times 10^8$ +/- $7,6 \times 10^7$
Ca	$4,67 \times 10^7$	$1,65 \times 10^8$	$4,06 \times 10^7$	$3,64 \times 10^7$	$5,72 \times 10^7$	$6,92 \times 10^7$ +/- $5,4 \times 10^7$
Kot	$3,86 \times 10^8$	$6,06 \times 10^8$	7×10^7	$1,58 \times 10^8$	$4,66 \times 10^8$	$3,37 \times 10^8$ +/- $2,2 \times 10^8$

96h-Wert, Therapiegruppe

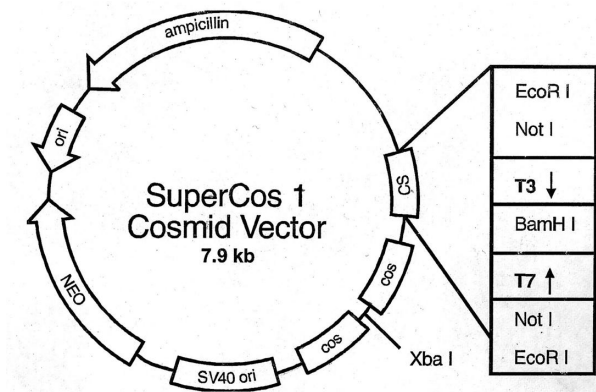
Organ	Tiernummer 2/16	2/17	2/18	2/19	2/20	Mittelwert +/-s
Le	0	0	5×10^2	1×10^2	0	$1,2 \times 10^2$ +/- $2,2 \times 10^2$
Mz	0	5×10^1	$1,5 \times 10^2$	2×10^2	5×10^1	9×10^1 +/- $8,2 \times 10^1$
Ni	0	0	$1,5 \times 10^2$	0	0	3×10^1 +/- $6,7 \times 10^1$
To	0	0	0	$4,5 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$ +/- $2,0 \times 10^2$
Il	$3,32 \times 10^5$	$2,83 \times 10^5$	$1,88 \times 10^7$	$4,52 \times 10^7$	2×10^7	$1,8 \times 10^7$ +/- $1,7 \times 10^7$
Ca	$8,88 \times 10^5$	$9,8 \times 10^5$	$8,83 \times 10^5$	$5,15 \times 10^7$	$5,38 \times 10^7$	$2,66 \times 10^7$ +/- $2,4 \times 10^7$
Kot	$2,25 \times 10^7$	$1,75 \times 10^7$	$4,49 \times 10^7$	$6,03 \times 10^7$	$1,01 \times 10^8$	$4,9 \times 10^7$ +/- $3,4 \times 10^7$

Zu 4.4.4.3.2 Therapieversuch mit PY 100, mehrfache orale Gabe

170h-Wert, Kontrollgruppe

Organ	Tiernummer 1/21	1/22	1/23	1/24	1/25	Mittelwert +/-s
Le	5×10^2	0	0	0	2×10^2	$1,4 \times 10^2 \pm 2,2 \times 10^2$
Mz	0	1×10^2	1×10^2	0	0	$4 \times 10^1 \pm 5,5 \times 10^1$
Ni	2×10^2	0	0	0	$4,5 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2 \pm 2 \times 10^2$
To	3×10^2	5×10^1	0	0	0	$7 \times 10^1 \pm 1,3 \times 10^1$
Il	$1,34 \times 10^8$	$4,5 \times 10^6$	$2,86 \times 10^7$	5×10^7	$4,4 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8 \pm 1,8 \times 10^8$
Ca	$2,51 \times 10^7$	$6,36 \times 10^7$	$5,19 \times 10^7$	$5,5 \times 10^7$	$5,12 \times 10^7$	$4,95 \times 10^7 \pm 1,4 \times 10^7$
Kot	$8,5 \times 10^7$	$1,82 \times 10^8$	$1,18 \times 10^8$	$2,88 \times 10^8$	$1,14 \times 10^8$	$1,57 \times 10^8 \pm 8,1 \times 10^7$

Abbildung 31 **Plasmidkarte des Vektors SuperCos 1** (Stratagene)



9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schichtung des CsCl Gradienten	20
Abbildung 2	Aktivitätstest nach Falkiner und Keane	22
Abbildung 3	Überprüfung der einzelnen Fraktionen auf Aktivität	46
Abbildung 4	Reinigungsschema für Enterocoliticin	47
Abbildung 5	Gelfiltration (GF) über Sephacyrl S 400-HR-Säule,	48
Abbildung 6	SDS-PAGE aus Gelfiltrationsfraktionen	48
Abbildung 7	Wachstumskurve des Stammes <i>Y. enterocolitica</i> 29930	49
Abbildung 8	Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Enterocoliticins	51
Abbildung 9	Westernblot mit gekennzeichneten Proteinbanden	55
Abbildung 10	Southernblot mit Sonde PY96	61
Abbildung 11	Southernblot der verdauten Cosmide	63
Abbildung 12	Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Phagen PY 100,	64
Abbildung 13	Agarose-Gelelektrophorese	65
Abbildung 14	Agarose-Gelelektrophorese: Abschätzen der Genomgröße	66
Abbildung 15	SDS-Page der Phagenproteine	67
Abbildung 16	Prozent überlebenden Yersinien in Abhängigkeit von der Enterocoliticinkonzentration	71
Abbildung 17	Effekt von Enterocoliticin auf die Überlebensrate	72
Abbildung 18	Effekt von Enterocoliticin auf in eukaryonte Zellen	72
Abbildung 19	Effekt von Gentamicin	73
Abbildung 20	Schema Probennahme bei Untersuchung des Infektionsverlaufs	76
Abbildung 21	Infektionsschema für den Therapieversuch mit dem Enterocoliticin	77
Abbildung 22	Therapeutische Enterocoliticingabe	79
Abbildung 23	Schema Probennahme Infektionsverlauf	80
Abbildung 24	Keimzahlen nach therapeutischer Phagengabe	82
Abbildung 25	Infektionsschema, einmalige intraperitoneale Phagengabe	83
Abbildung 26	Einmalige intraperiotoneale Phagengabe	85
Abbildung 27	Infektionsschema für einmalige orale Phagengabe	86
Abbildung 28	einmalige Phagengabe oral	88
Abbildung 29	Infektionsschema: mehrfache orale Phagengabe	89
Abbildung 30	mehrfache orale Phagengabe	92
Abbildung 31	Plasmidkarte des Vektors SuperCos 1 (Stratagene)	137

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Benutzte Restriktionsenzyme.....	23
Tabelle 2	Ausgetropfte Gradienten.....	25
Tabelle 3	Pipettierschema zur Gelherstellung von SDS-Gelen.....	30
Tabelle 4	Molekulargewichte der Standardproteine.....	31
Tabelle 5:	Oligonukleotidsonden	35
Tabelle 6	Reinigungstabelle	47
Tabelle 7	getestete Bakterienstämme auf Enterocoliticinempfindlichkeit	52
Tabelle 8	Wirkungsbereich von Enterocoliticin	53
Tabelle 9	Durch Edman-Abbau analysierte Aminosäuren	56
Tabelle 10	Codon-Usage Tabelle für <i>Y. enterocolitica</i>	57
Tabelle 11	Länge der synthetisierten Oligonukleotide	58
Tabelle 12	Ergebnis der Optimierung der Hybridisierungen.....	59
Tabelle 13	Ergebnis der Hybridisierungen.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Tabelle 14	Überprüfung des Wirtsspektrum von PY 100 mittels Softagaroverlaytest.....	68
Tabelle 15	Größenvergleich verschiedener Bacteriocine und einem T4-Phagenschwanz	96

Danksagung

An dieser Stelle danke ich....

...Herrn Prof. Dr. Appel für die freundliche Bereitstellung des Themas.

...Herrn Dr. Strauch für die Betreuung der Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

...Frau Prof. Dr. Krüger für ihre Bereitschaft zur Betreuung dieser Promotionsarbeit.

...Frau Dr. Dersch, die mich in die Geheimnisse der Zellkulturversuche einweihte.

...Herrn Dr. Hertwig für die Einleitung in die Welt der Proteinbiochemie.

...den Mitgliedern der Arbeitsgruppe P12, insbesondere bei Antje Konietzny und Gudrun Hultsch, die mich so fleißig unterstützt haben. Außerdem danke ich Daniela, Iris und Nina für den Beistand zu jeder Zeit.

...meiner Familie, die mich fortwährend unterstützt und immer an mich geglaubt haben.

...Uli, der immer da war, wenn ich ihn brauchte